

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-107066

(43)Date of publication of application : 09.04.2003

(51)Int.Cl.

G01N 30/72

G01N 27/62

G01N 30/00

G01N 30/06

G01N 30/60

G01N 30/88

(21)Application number : 2002-208687

(71)Applicant : UNIV OF WASHINGTON

(22)Date of filing : 25.08.1999

(72)Inventor : AEBERSOLD RUDOLF HANS
GELB MICHAEL H
GYGI STEVEN P
SCOTT C RONALD
TURECEK FRANTISEK
GERBER SCOTT A
RIST BEATE

(30)Priority

Priority number : 1998 097788
1998 099113

Priority date : 25.08.1998
03.09.1998

Priority country : US

US

(54) QUICK QUANTITATIVE ANALYSIS OF PROTEIN OR PROTEIN FUNCTION IN COMPOSITION MIXTURE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method used in a proteome analysis for conquering the limitation peculiar to the conventional technique, and to provide a reagent.

SOLUTION: An automation LC/MS/MS system comprises an auto sampler that is subjected to fluid connection to a capillary HPLC (a), an electro spray ionization triple quadrupole electrode MS/MS apparatus that is subjected to fluid connection to the capillary HPLC (b), and device control and a data analysis system that are electrically connected to the autosampler, the capillary HPLC, and an MS/MS apparatus.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

12.08.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-107066

(P2003-107066A)

(43) 公開日 平成15年4月9日 (2003.4.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 30/72 27/62		G 0 1 N 30/72 27/62	C L V X B
30/00		30/00	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 75 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-208687 (P2002-208687)
 (62) 分割の表示 特願2000-566460 (P2000-566460) の
 分割
 (22) 出願日 平成11年8月25日 (1999.8.25)
 (31) 優先権主張番号 60/097, 788
 (32) 優先日 平成10年8月25日 (1998.8.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 60/099, 113
 (32) 優先日 平成10年9月3日 (1998.9.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 397079591
 ユニバーシティ オブ ワシントン
 アメリカ合衆国 ワシントン 98105-
 2143, シアトル, エヌ. イー. 45ティ
 エイチ ストリート 1107, スイート
 200
 (72) 発明者 ルドルフ ハンス アエバーソールド
 アメリカ合衆国 ワシントン 98040,
 マーサー アイランド, エスイー 78テ
 イーエイチ ストリート 8609
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合した混合物中のタンパク質またはタンパク質機能の迅速定量分析

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、従来の技術に固有の制限を克服する proteome 分析において使用され得る方法および試薬を提供することを課題とする。

【解決手段】 自動化 LC/MS/MS システムであって、以下：

(a) キャピラリー HPLC と流体接続するオートサンプラー

(b) 該キャピラリー HPLC と流体接続するエレクトロスプレーイオン化三連四重極 MS/MS 装置；および

(c) 該オートサンプラー、キャピラリー HPLC および MS/MS 装置と電気接続する装置制御およびデータ分析システムを備える、システム。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 自動化 LC/MS/MS システムであって、以下：

(a) キャピラリー HPLC と流体接続するオートサンプラー；

(b) 該キャピラリー HPLC と流体接続するエレクトロスプレーイオン化三連四重極 MS/MS 装置；および

(c) 該オートサンプラー、キャピラリー HPLC および MS/MS 装置と電気接続する装置制御およびデータ分析システムを備える、システム。

【請求項 2】 タンパク質のアミノ酸配列によってタンパク質を同定するための方法であって、以下の工程：

(a) 特定のプロテアーゼを使用してタンパク質を切断し、ペプチドのサンプルを生成する工程；

(b) 該サンプルをオートサンプラーに配置する工程；

(c) 各々のペプチドのサンプルをキャピラリー HPLC システムに別々に注入し、該ペプチドを分離する工程；

(d) エレクトロスプレーイオン化を使用して、該分離したペプチドをイオン化する工程；

(e) 該イオン化されたペプチドの質量を、三連四重極タンデム質量分析計を使用して測定する工程；

(f) 選択されたイオン化されたペプチドを、ペプチドをフラグメント化するための不活性ガスを含む衝突セル内で、

i) 該ペプチドを衝突させ；

i i) 該ペプチドフラグメントの質量を測定および記録することによって、配列決定する工程；および (g) 工程 (f) において収集された質量データを使用して、配列データベースを検索する工程を包含する、方法。

【請求項 3】 タンパク質のアミノ酸配列によってタンパク質を同定するための方法であって、以下の工程：

(a) 特定のプロテアーゼを使用してタンパク質を切断し、ペプチドのサンプルを生成する工程；

(b) 該サンプルをオートサンプラーに配置する工程；

(c) 固相抽出デバイスを使用して該ペプチドを濃縮する工程；

(d) 有機溶媒中で該濃縮したペプチドを溶出する工程；

(e) 電気泳動スタッピングおよび/または等速電気泳動によって、該溶出したペプチドをさらに濃縮する工程；

(f) キャピラリー電気泳動によって、該濃縮したペプチドを分離する工程；

(g) エレクトロスプレーイオン化を使用して、該分離したペプチドをイオン化する工程；

(h) 該イオン化されたペプチドの質量を、三連四重極タンデム質量分析計を使用して測定する工程；

(i) 選択されたイオン化されたペプチドを、ペプチドをフラグメント化するための不活性ガスを含む衝突セル

内で、

i) 該ペプチドを衝突させ；

i i) 該ペプチドフラグメントの質量を測定および記録することによって、配列決定する工程；および (j) 工程 (i) において収集された質量データを使用して、配列データベースを検索する工程を包含する、方法。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の方法であって、前記固相抽出デバイスが、融合シリカ分離キャピラリーにパックされた逆相クロマトグラフィーカラムを備える、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、タンパク質の混合物においてタンパク質またはタンパク質の機能の迅速かつ定量的分析のための、分析試薬およびこれらの試薬を使用する質量分析に基づく方法を提供する。

【0002】 本発明は、米国科学財団科学技術センター分子生物学（補助金 5 T 3 2 H G および B I R 9 2 1 4 8 2 1）ならびに国立衛生研究所（N I H 補助金 R R 1 1 8 2 3、T 3 2 H G 0 0 0 3 5、H D - 0 2 2 7 4 および G M 6 0 1 8 4）からの資金援助によってなされた。合衆国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】（関連出願の相互参照） 本出願は、1998 年 8 月 25 日に提出された米国仮特許出願第 60/097,788 号および 1998 年 9 月 3 日に提出された同第 60/099,113 号から、米国特許法 119 (e) 項に基づく優先権を有し、これら両方は、その全体において参照として援用される。

【0004】

【従来の技術】（発明の背景） ゲノム技術は、原則として、完全なゲノム配列を決定し、細胞中で発現された各遺伝子について mRNA レベルを定量的に測定することが可能な点まで進んでいる。いくつかの種について、今や完全なゲノム配列が決定され、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の一本の鎖について、各発現された遺伝子についての mRNA レベルが、種々の増殖条件下で正確に定量化された (Velculescu ら, 1997)。比較 cDNA 配列分析および関連する技術は、mRNA レベルにおける遺伝子発現における誘導される変化を、調査される細胞または組織によって発現される多数の遺伝子（ある場合では、すべての遺伝子）の発現レベルを同時にモニターすることによって決定するために使用されている (Shalton ら, 1996)。さらに、生物学的技術およびコンピューター技術が、特定の機能を遺伝子配列と関連させるために使用されている。生物学的システムの構造、制御および機構において、これらの技術によって得られたデータの解釈は、かなりの挑戦として認識されている。特に、ゲノム分析のみによって生物学的プロセスの機構を説明するの

は非常に困難である。

【0005】タンパク質は、ほとんどすべての生物学的プロセスの制御および実行に対して必須である。合成の速度およびタンパク質の半減期ならびに従ってそれらの発現レベルはまた転写後に制御される。さらに、タンパク質の活性は、しばしば転写後の修飾（特にタンパク質リン酸化）によって修飾され、DNAおよびタンパク質を含む他の分子とそのタンパク質の関係に依存する。従って、タンパク質の発現のレベルも、タンパク質の活性の状態も両方とも、遺伝子配列からも対応するmRNA転写の発現レベルさえからも直接的には明らかではない。生物学的システムの完全な記述が、そのシステムを構成するタンパク質の同定、定量および活性の状態を示す測定を含むことは必須である。細胞または組織中で発現されたタンパク質の大規模な（最終的には全体的な）分析がproteome分析と呼ばれている（Penningtonら、1997）。

【0006】現在において、タンパク質分析技術は、ゲノム技術の自動化のスループットおよびレベルに達していない。proteome分析の最も一般的な実施は、最も一般的に二次元ゲル電気泳動（2DE）による複合したタンパク質のサンプルの分離、および引き続く分離されたタンパク質種の配列同定に基づく（Ducretら、1998；Garrelisら、1997；Linkら、1997；Shevchenkoら、1996；Gygiら、1999；Boucherieら、1996）。このアプローチは、強力な質量分析技術の発展、ならびタンパク質およびペプチド質量スペクトルデータと配列データベースとを関連付け、従って素早く決定的にタンパク質を同定するコンピューターアルゴリズムの発展によって大変革された（Engら、1994；MannおよびWilm、1994；Yatesら、1995）。この技術は、銀染色を含む従来のタンパク質染色法によって検出可能な必須の任意のタンパク質の同定を現在可能にする感度のレベルに達している（FigleyおよびAebersold、1998；Figleyら、1996；Figleyら、1997；Shevchenkoら、1996）。しかし、サンプルがプロセスされる引き続く方法は、サンプルのスループットを制限し、最も敏感な方法は、自動化が困難であり、低量のタンパク質（例えば調節タンパク質）は、前濃縮なしでは検出を逃れ、従って、技術の動的な範囲を事実上制限する。2DE/（MS）N法において、タンパク質は、2DEゲルの染色点の濃度測定によって定量化される。

【0007】マイクロキャピラリー液体クロマトグラフィー（ μ LC）およびデータベース検索と組み合わせた自動化データ依存電気スプレーイオン化（ESI）タンデム型分子質量分析（MSⁿ）のための方法および機器の発展は、ゲル分離されたタンパク質の同定の感度およびスピードを有意に増加した。proteome分析に

対する2DE/MSⁿアプローチの代替として、複合したタンパク質混合物の消化によって生成されるペプチド混合物のタンデム型分子質量分析による直接分析が、提案された（Dongら、1997）。 μ LC-MS/MSはまた、ゲル電気泳動分離なしで混合物から直接個々のタンパク質の大規模同定に首尾よく使用された。（Linkら、1999；Opitexら1997）。これらのアプローチがタンパク質同定を劇的に加速しながら、分析されたタンパク質の量は、容易には決定され得ず、これらの方法は、2DE/MS/MSアプローチによっても遭遇する動的な範囲の問題を実質的に軽減することは示されていない。従って、複合したサンプルの低量のタンパク質はまた、前の濃縮なしで μ LC/MS/MS法によって分析するのは困難である。

【0008】従って、現在の技術は、タンパク質混合物の成分を同定するのに適しているが、混合物中のタンパク質の量も、活性の状態も両方とも測定可能ではないことは明らかである。現在のアプローチの進展的な改良でさえ、慣用的な定量的および機能のproteome分析を実現するのに十分な性能を進歩させそうでない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来の技術に固有の制限を克服するproteome分析において使用され得る方法および試薬を提供する。記載される基本的なアプローチは、複合されたサンプル（例えば、細胞、組織およびその機能）におけるタンパク質発現の定量的分析、複合したサンプルの特異的タンパク質の検出および定量、および複合したサンプルの特異的酵素活性の定量的測定のために使用され得る。

【0010】このことについて、正常または疾患状態と関連するタンパク質またはタンパク質の機能の存在、不在、欠乏または過剰を検出する臨床的および診断的アッセイについて、複数の分析技術が現在得られる。これらの技術は非常に敏感である一方で、これらは、産物の化学的種形成を必ずしも提供せず、結果として、単一のサンプルにおいて同時にいくつかのタンパク質または酵素をアッセイすることにおいて困難であり得る。現在の方法は、通常のセットの臨床的症狀に導く種々の酵素の異常発現またはそれらの機能不全を区別し得ない。本明細書において、本方法および試薬は、複数のタンパク質およびタンパク質の反応を同時に（複数）モニターするための臨床的および診断的アッセイに使用され得る。

【0011】

【課題を解決するための手段】（本発明の要旨）本発明は、タンパク質の混合物においてタンパク質またはタンパク質の機能の迅速かつ定量的分析のための、分析試薬およびこれらの試薬を使用する質量分析に基づく方法を提供する。この分析方法は、定量的に使用され得、特に細胞および組織の全体的なタンパク質発現プロフィールの定量的な分析（すなわち、proteomeの定量的

分析)のために使用され得る。この方法はまた、細胞、組織または生物学的流体の発現レベルが、サンプルが由来する細胞、組織または生物についての、刺激(例えば、薬剤の投与、または潜在的に毒性の物質との接触)によって、環境の変化(例えば、栄養レベル、温度、時間の経過)によって、あるいは状態または細胞状態の変化(例えば、疾患状態、悪性腫瘍、位置特異的変異、遺伝子ノックアウト)によって影響されるタンパク質をスクリーニングし同定するために使用され得る。このようなスクリーニングで同定されたタンパク質は、変化した状態に対するマーカーとして機能し得る。例えば、正常な細胞および悪性腫瘍細胞のタンパク質発現プロファイルの比較は、存在または不在が、悪性腫瘍の特徴であり診断であるタンパク質の同定に至り得る。

【0012】例示的な実施態様において、本明細書においてこの方法は、特定のタンパク質の酵素活性の発現または状態の変化をスクリーニングするために使用され得る。これらの変化は、薬学的アゴニストまたはアンタゴニストあるいは潜在的に有害または毒性の物質を含む、種々の化学物質によって誘導され得る。このような変化の知識は、酵素に基づく疾患を診断するため、および細胞の複合調節ネットワークを調査するために有用であり得る。

【0013】本明細書においてこの方法は、生物学的流体(例えば、血液)、または細胞または組織の所定のタンパク質またはタンパク質機能の存在、不在、欠乏、または過剰を検出するための、種々の臨床的および診断的分析を実行するために使用され得る。この方法は、タンパク質の複合した混合物(すなわち、5個以上の別個のタンパク質またはタンパク質機能を含むもの)の分析に特に有用である。

【0014】本発明の方法は、親和性標識タンパク質反応性試薬を使用し、これは、複合した混合物からペプチドフラグメントまたは所定のタンパク質との反応産物(例えば、酵素反応の産物)の選択的単離を可能にする。単離されたペプチドフラグメントまたは反応産物は、それらの混合物においてタンパク質の存在またはタンパク質機能(例えば、酵素活性)の存在それぞれの特徴を有する。単離されたペプチドまたは反応産物は、質量分析(MS)技術によって特徴付けられる。特に、単離されたペプチドの配列は、タンデム型MS(MSⁿ)技術を使用し、配列データベース検索技術の適用によって決定され得、配列決定されたペプチドが由来するタンパク質が同定され得る。この試薬はまた、種々のサンプルにおいてタンパク質の相対的な量の質量分析による定量的な決定を容易に促進する、単離されたペプチドまたは反応産物の差次的な同位体標識を提供する。また、内部標準として差次的に同位体的に標識化された試薬の使用は、サンプル中に存在する1つ以上のタンパク質または反応産物の絶対的な量の定量的な決定を容易にする。

【0015】一般的に、本発明の親和性標識化タンパク質反応性試薬は、3つの部分を有する：リンカー基

(L)によってタンパク質反応性基(PRG)に共有結合された親和性標識(A)：

A-L-PRG

リンカーは、例えば、リンカーの1つ以上の原子をその安定な同位体に置換することによって、差次的に同位体的に標識化され得る。例えば、水素は、重水素で置換され得、C¹²はC¹³で置換され得る。

【0016】親和性標識Aは、捕捉試薬(CR)に共有結合的または非共有結合的に選択的に結合する分子ハンドルとして機能する。CRへの結合は、Aでタグ化されたかまたは標識化されたペプチド、基質または反応産物の単離を容易にする。特定の実施態様において、Aは、ストレプトアビジン(streptavidin)またはアビジンである。親和性タグ化された物質(そのうちのいくらかが同位体的に標識化される)の親和性単離の後、Aおよび捕捉試薬の間の相互作用が、単離された物質のMS分析を可能にするために分裂または切断される。親和性標識は、捕捉試薬から、置換リガンド(Aを含まないかAの誘導体であり得る)の添加によって、あるいは溶媒の条件(例えば溶媒の種類もしくはpH)または温度条件を変化させることによって置換されえるか、あるいはリンカーが、単離された物質をMS分析のために放出するために、化学的、酵素的、熱的または光化学的に切断され得る。

【0017】PRG基の2つのタイプは、本明細書中で以下で提供される：(a)タンパク質官能基と選択的に反応し、特定の部位にてタンパク質をタグ化する共有結合または非共有結合を形成する基、および(b)例えば酵素に対する基質である、タンパク質の作用によって形質転換されるもの。特定の実施態様において、PRGは、特定のタンパク質の基に対して特異的反応性(例えば、スルフヒドリル基に対する特異性)を有する基であり、複合した混合物においてタンパク質を選択的にタグ化するために一般的に有用である。スルフヒドリルに特異的な試薬は、システインを含むタンパク質をタグ化する。他の特定の実施態様では、PRGは、目的の酵素の作用によって選択的に切断(A-Lを残す)または修飾(A-L-PRG'を与える)する酵素基質である。

【0018】例示的な試薬は、以下の式を有する：

【0019】

【化1】
A-B1-X1-(CH2)n-[X2-(CH2)m]x-X3-(CH2)p-X4-B2-PRG

ここで：Aは親和性標識である；PRGは、タンパク質反応性基である；X¹、X²、X³およびX⁴は、リンカー基において、互いに独立し、X²は他のX²から独立して、O、S、NH、NR、NRR'⁺、CO、COO、COS、S-S、SO、SO₂、CO-NR'、CS-NR'、Si-O、アリールまたはジアリール基か

ら選択され得るか、あるいは $X^1 \sim X^4$ は、存在しなくてもよいが、好ましくは少なくとも1つの $X^1 \sim X^4$ は、存在する； B^1 および B^2 は、互いに独立して、AまたはPRG基のリンカーへの結合を促進し得るかそれらの基のリンカーからの所望でない切断を防ぎ得る任意の部分であり、そして例えば COO 、 CO 、 $CO-NR'$ 、 $CS-NR'$ から選択され得、そして単独または他の基（例えば $(CH_2)_q-CO-NR'$ 、 $(CH_2)_q-CS-NR'$ 、または $(CH_2)_q$ ）と組み合わせ、1つ以上の CH_2 基を含み得る； n 、 m 、 p および q は、0～約100までの値を有し得るすべての数であり、好ましくは、 n 、 m 、 p または q の1つは、0ではなく、そして x はまた0～約100までの範囲であり得る整数であり、ここで $n+xm+p+q$ は、好ましくは約100未満であり、より好ましくは約20未満である； R は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、またはアリール基である；そして R' は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、またはアリール基である。

【0020】リンカーの CH_2 基の1つ以上は、小さな（ $C1 \sim C6$ ）アルキル、アルケニル、またはアルコキシ基、アリール基で必要に応じて置換され得、例えば酸性基または塩基性基または永久的な正の電荷または負の電荷を保持する基のようなイオン化を促進する官能基で置換され得る。リンカーの CH_2 基を接続する1つ以上の単結合は、2重結合または3重結合で置換され得る。好ましい R および R' アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアルコキシ基は、1～6個の炭素原子を有する小さなものである。

【0021】リンカーの原子の1つ以上は、安定な同位体で置換され得、1つ以上の実質的に化学的に同一であるが同位体的に区別可能な試薬を生成する。例えば、リンカーの1つ以上の水素は、重水素で置換され得、同位体的に重い試薬を生成する。

【0022】例示的な実施態様では、リンカーは、切断されて親和性タグを除き得る基を含む。切断可能なリンカー基が使用される場合、親和性タグ化されたペプチド、基質または反応産物が CR と一緒に親和性標識化を使用して単離された後に、これは典型的に切断される。この場合において、リンカーにおいて標識化する任意の同位体は、好ましくは、タンパク質、ペプチド、基質または反応産物に結合したままである。

【0023】リンカー基は、とりわけ以下を含む：エーテル、ポリエーテル、エーテルジアミン、ポリエーテルジアミン、ジアミン、アミド、ポリアミン、ポリチオエーテル、ジスルフィド、シリルエーテル、アルキルまたはアルケニル鎖（直鎖または分枝鎖および環でありえる部分）、アリール、ジアリールまたはアルキルアリール基。リンカーのアリール基は、1つ以上のヘテロ原子（例えば、 N 、 O または S 原子）を含み得る。

【0024】1つの局面において、本発明は、親和性標識化された試薬を使用する複合した混合物の1つ以上のタンパク質の同定および定量のための質量分析方法を提供し、ここで、PRGは、ペプチドにおいて典型的に見出される特定の基（例えば、スルフィドリル、アミノ、カルボキシ、ホモセリンラクトン基）と選択的に反応する基である。種々のPRG基を有し、1つ以上の親和性標識化試薬が、タンパク質を含む混合物に導入され、この試薬がこれらと親和性標識とタグ化するための特定のタンパク質と反応する。ジスルフィド結合を少なくするためにタンパク質混合物を前処理するかまたはそれ以外で親和性標識化を容易にすることが必要であり得る。親和性標識化された試薬との反応の後に、複合した混合物のタンパク質は、例えば酵素的に、多数のペプチドに切断される。この消化工程は、タンパク質が比較的小さい場合、必要でなくても良い。親和性標識でタグ化されたペプチドは、それらの CR に対する選択的結合によって、親和性単離法（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）によって単離される。単離されたペプチドは、Aの置換またはリンカーの切断によって CR から放され、放された物質は、液体クロマトグラフィー/質量分析（ LC/MS ）によって分析される。次いで、1つ以上のタグ化されたペプチドの配列は、 MS^n 技術によって決定される。タンパク質から誘導される少なくとも1つのペプチド配列は、そのタンパク質に特徴的であり、混合物中におけるその存在を示す。従って、ペプチドの配列は、典型的には、混合物中の1つ以上のタンパク質を同定するのに十分な情報を提供する。

【0025】タンパク質混合物を含む1つ以上の異なるサンプル（例えば、生物学的流体、細胞または組織溶解物など）のタンパク質の定量的な相対量は、化学的に同一で親和性タグ化され、差次的に同位体的に標識化された試薬を使用して決定され得、異なるサンプル中のタンパク質を、親和性タグ化し、差次的に同位体的に標識化する。この方法において、比較されるサンプルは、親和性標識で特定のタンパク質をそこでタグ化するために、同位体的に異なった標識化試薬で処理される。次いで、処理されたサンプルは、好ましくは等量で組み合わせられ、組み合わせられたサンプル中のタンパク質は、必要であれば、酵素的に消化され、ペプチドを生成する。ペプチドのうちのいくらかは、親和性タグ化され、さらに異なるサンプル由来のタグ化されたペプチドは、差次的に同位体的に標識化される。上記のように、親和性標識化されたペプチドは、単離され、捕捉試薬から放され、（ LC/MS ）によって分析される。タンパク質由来のペプチドの特徴は、サンプル中のタンパク質の同定を可能にする MS^n 技術を使用して配列決定される。各サンプル中の所定のタンパク質の相対的量は、そのタンパク質由来の差次的に同位体的に標識化されたペプチドから生じるイオンの相対的存在比を比較することによって決

定される。この方法は、異なるサンプル中の既知のタンパク質の相対的量を評価するために使用され得る。さらに、この方法がサンプルに存在し得るタンパク質の種類についての任意の先行知識を必要としないので、この方法は、試験されるサンプル中において異なるレベルで存在するタンパク質を同定するために使用され得る。さらに詳細には、この方法は、細胞、組織または生物学的流体において異なる発現を示すタンパク質をスクリーニングし、同定するために適用され得る。複合した混合物中の特定のタンパク質の絶対量を決定することもまた可能である。この場合、既知の量の内部標準（定量化される混合物中のそれぞれのタンパク質について1つ）が、分析されるサンプルに添加される。内部標準は、内部標準がペプチドまたは親和性タグ部分のいずれかにおいて差次的に同位体的に標識化され、定量化される親和性タグ化されたペプチドと異なることを除いて、定量化される親和性タグ化されたペプチドと同一の化学構造である親和性タグ化されたペプチドである。内部標準は、他の方法で分析されるサンプルで提供され得る。例えば、特定のタンパク質またはセットのタンパク質は、同位体標識化された親和性タグ試薬で化学的にタグ化され得る。この物質の既知の量が、分析されるサンプルに添加され得る。あるいは、特定のタンパク質またはセットのタンパク質は、重原子同位体で標識化され、次いで、親和性標識化試薬で誘導され得る。

【0026】また、単一の分析で複数のサンプル中の特定のタンパク質のレベルを定量すること（多重化）が可能である。この場合、異なるサンプルから異なる親和性タグ化ペプチドに存在するタンパク質を誘導するために使用される親和性タグ化試薬は、質量分析によって選択的に定量化され得る。

【0027】本発明のこの局面において、この方法は、生物学的流体、細胞または組織中の特定のタンパク質の定量的測定を提供し、異なる細胞および組織中の全体的なタンパク質発現プロファイルを決定するために適用され得る。同じ一般的戦略が、タンパク質との反応性について異なる特異性を有する親和性試薬を使用することによって、タンパク質の修飾の状態の、proteome ワイドな、定性的なそして定量的な分析を達成するために拡張され得る。本発明の方法および試薬は、複合した混合物中の低存在比タンパク質を同定するために使用され得、膜、細胞表面タンパク質のような特定の群またはクラスのタンパク質、あるいは小器官、亜細胞（sub-cellular）画分、または免疫沈降のような生化学的画分内に含まれるタンパク質を選択的に分析するために使用され得る。さらに、これらの方法は、異なる細胞状態において発現されたタンパク質の差を分析するために適用され得る。例えば、本明細書中でこの方法および試薬は、癌のような疾患状態を示す1つ以上のタンパク質の存在または不在の検出のための診断的アッセイ

において使用され得る。

【0028】第2の局面において、本発明は、サンプルにおいてタンパク質の機能（例えば、酵素活性）の存在または不在の検出のためのMS方法を提供する。この方法はまた、サンプルにおけるタンパク質の機能の欠乏または過剰（通常のレベルを超える）を検出するために使用され得る。分析され得るサンプルには、組織および細胞を含む、種々の生物学的流体および物質が挙げられる。この場合、親和性標識化試薬のPRGは、目的の酵素に対する基質である。親和性標識化基質は、目的のそれぞれの酵素に提供され、目的の酵素がサンプルに存在する場合、それらが反応して親和性標識化生成物を生成するサンプルに導入される。親和性標識でタグ化された未反応の基質または生成物は、CRに対する選択的結合を介して、親和性単離方法（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）によって単離される。単離されたタグ化基質および生成物は、質量分析法によって分析される。親和性標識化生成物には、基質がリンカーから完全に切断されるもの、または基質が目的のタンパク質との反応によって修飾されるものが挙げられる。親和性標識化生成物の検出は、タンパク質機能がサンプルに存在することを示す。親和性標識化生成物の検出がほとんど無いかまたは無いことは、サンプルにおけるタンパク質の機能が、それぞれ欠乏または不在であることを示す。

【0029】サンプル中に存在する、例えば酵素的活性に関して測定される、選ばれたタンパク質の量は、試薬基質の酵素反応の期待される生成物の同位体的に標識化されたアナログである内部標準の既知量を導入することによって測定され得る。内部標準は、期待される酵素反応生成物に対して実質的に化学的に同一であるが、同位体的に区別可能である。与えられたサンプルにおけるタンパク質機能（例えば、酵素活性）のレベルは、他のサンプルまたはコントロール（ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールのいずれか）での活性レベルと比較され得る。従って、この手順は、サンプルにおけるタンパク質機能の存在、不在、欠乏または過剰を検出し得る。この方法は、既知時間に渡って形成される生成物の量を測定し得るので、酵素反応の速度を定量化することができる。この反応は、種々のタンパク質の機能に対して選択的な複数の親和性標識化基質の同時使用によって、そして定量化が望ましいならば、単一のサンプル中の複数のタンパク質の機能に対して分析するために、期待される生成物に対する対応する内部標準を含むことによって、多重化され得る。

【0030】1つの局面において、本発明は、タンパク質の混合物を含む1つまたはそれ以上のサンプル中の1つまたはそれ以上のタンパク質またはタンパク質機能を同定するための方法であって、該方法は以下：

(a) 各サンプルに対して、親和性タグ化し、実質的に化学的に同一かつ差次的に同位体的に標識したタンパク

質反応試薬を提供する工程であって、ここで該試薬は以下の式を有し：

A-L-PRG

ここで、Aは、捕捉試薬に選択的に結合する親和性標識であり、Lは1つまたはそれ以上の原子が、1つまたはそれ以上の安定同位体で差次的に標識され得るリンカー基であり、そしてPRGは特定のタンパク質官能基と選択的に反応するか、または酵素に対する基質であるタンパク質反応基である、工程；

(b) 各サンプルを1つの該タンパク質反応試薬と反応させ、サンプル中に親和性タグ化タンパク質または親和性タグ化酵素生成物を提供する工程であって、それによって異なるサンプル中の親和性タグ化タンパク質および酵素生成物が、安定同位体で差次的に標識される、工程；

(c) 選択的にAと結合する該捕捉試薬を使用して該サンプルの親和性タグ化成分を捕捉する工程；

(d) 該親和性タグ化成分と該捕捉試薬との間の相互作用を中断することによって、該捕捉試薬から捕捉された親和性タグ化成分を放出する工程；および(e) 質量分析計によって該放出した親和性タグ化成分を検出しそして同定する工程、を包含する、方法を提供する。

【0031】1つの実施形態において、サンプル中の前記親和性タグ化タンパク質が、該親和性タグ化タンパク質を親和性タグ化ペプチドに転化するために、該親和性タグ化タンパク質の捕捉前または後に、酵素学的にまたは化学的に処理される。

【0032】別の実施形態において、1つまたはそれ以上の前記親和性タグ化タンパク質のタンパク質部分が、タンデム型質量分析計によって配列決定され、前記ペプチドが由来する該親和性タグ化タンパク質を同定する。

【0033】1つの実施形態において、1つまたはそれ以上の前記親和性タグ化タンパク質のタンパク質部分が、タンデム型質量分析計によって配列決定され、該タンパク質を同定する。

【0034】1つの実施形態において、サンプル中の1つまたはそれ以上の前記タンパク質の量がまた、質量分析計によって決定され、定量されるべき該タンパク質のそれぞれに対して既知の量の1つまたはそれ以上の内部標準をサンプル中に導入する工程をさらに包含する。

【0035】1つの実施形態において、PRGが酵素基質であり、そしてサンプル中の1つまたはそれ以上の酵素の酵素学的速度が、親和性タグ化酵素生成物の定量によって決定され、該速度が定量される酵素の該親和性タグ化酵素生成物のそれぞれに対して、既知の量の1つまたはそれ以上の内部標準をサンプル中に導入する工程をさらに包含する。

【0036】1つの実施形態において、前記放出される親和性タグ化成分が、質量分析計によって該成分を検出されそして同定する前に、クロマトグラフィーによって

分離される。

【0037】1つの実施形態において、1つのサンプル中の複数のタンパク質またはタンパク質機能が検出されそして同定される。

【0038】1つの実施形態において、サンプル中の1つまたはそれ以上のタンパク質が、親和性タグと反応し得る官能基を露出させるために化学的にまたは酵素学的に処理される工程をさらに包含する。

【0039】1つの実施形態において、前記PRGが1つまたはそれ以上の酵素に対する酵素基質であり、この欠乏が疾患状態に連結される。

【0040】1つの実施形態において、親和性タグ化し、実質的に化学的に同一でかつ差次的に同位体的に標識した酵素基質が、サンプル中で検出されそして同定されるべき各酵素に対して提供される。

【0041】1つの実施形態において、PRGが、特定のタンパク質官能基と選択的に反応するタンパク質反応基であり、そして複数のタンパク質が単一のサンプル中で検出されそして同定される。

【0042】1つの実施形態において、タンパク質との反応について異なる特異性を有し、2つまたはそれ以上の親和性タグ化し、実質的に化学的に同一であり、そして差次的に同位体的に標識したタンパク質反応試薬が提供され、そして分析されるべき各サンプルと反応される。

【0043】別の実施形態において、サンプル中の前記タンパク質の全てが検出されそして同定される。

【0044】1つの実施形態において、2つまたはそれ以上の異なるサンプル中の1つまたはそれ以上のタンパク質の相対量が決定され、前記差次的に標識したサンプルを合わせる工程、該合わせたサンプルから親和性タグ化成分を捕捉する工程、および前記親和性タグ化し差次的に標識したタンパク質、または該タンパク質に由来する、該親和性タグ化し差次的に標識したペプチドの相対存在度を測定する工程をさらに包含する。

【0045】1つの実施形態において、1つまたはそれ以上の異なるサンプル中の膜タンパク質の前記相対量を測定する。

【0046】別の実施形態において、異なるサンプルが、異なるオルガネラまたは異なる細胞成分画分に由来タンパク質を含む。

【0047】別の実施形態において、異なるサンプルが、異なる環境状態もしくは栄養状態、異なる化学的刺激もしくは物理的刺激、または異なる時間に応答して発現されるタンパク質を表す。

【0048】別の局面において、本発明は、タンパク質を含む2つまたはそれ以上のサンプル中のタンパク質の相対的発現レベルを測定するための方法であって、該方法は以下：

(a) 各サンプルに対して、親和性タグ化し、実質的に

化学的に同一かつ差次的に同位体的に標識したタンパク質反応試薬を提供する工程であって、ここで該試薬は以下の式を有し：

A-L-PRG

ここで、Aは、捕捉試薬に選択的に結合する親和性標識であり、Lは安定同位体で差次的に標識され得るリンカー基であり、そしてPRGは特定のタンパク質官能基と選択的に反応するタンパク質反応基である、工程；

(b) 各サンプルを1つのタンパク質反応試薬と反応させ、サンプル中に親和性タグ化タンパク質を提供する工程であって、それによって異なるサンプル中の親和性タグ化タンパク質が、安定同位体で差次的に標識される、工程；

(c) 該差次的に標識したサンプルを合わせ、そしてその中で該タンパク質を切断しそしてペプチドを生成させるために該合わせたサンプルを処理する工程；

(d) 選択的にAと結合する該捕捉試薬を使用して該合わせたサンプルの親和性タグ化した差次的に標識したペプチドを捕捉する工程；

(e) 該親和性タグ化ペプチドと該捕捉試薬との間の相互作用を中断することによって、該捕捉試薬から該捕捉した親和性タグ化した差次的に標識したペプチドを放出する工程；および

(f) 質量分析計によって該放出した親和性タグ化した差次的に標識したペプチドを検出しそして同定する工程；

(g) 該親和性タグ化した差次的に標識したペプチドが由来する該タンパク質の相対発現レベルを決定するために、親和性タグ化した差次的に標識したペプチドから発生した同位体的に異なるイオンピークの相対存在度を測定する工程、を包含する、方法を提供する。

【0049】別の局面において、本発明は、以下の一般式：

A-L-PRG

を有するタンパク質の質量分析計分析のための試薬であり、ここで、Aは、捕捉試薬に選択的に結合する親和性標識であり、Lは、安定同位体で差次的に標識され得るリンカー基であり、そしてPRGは特定のタンパク質官能基と選択的に反応するタンパク質反応基である、試薬を提供する。

【0050】1つの実施形態において、PRGが、スルフィドリル反応基またはアミン反応基である。

【0051】1つの実施形態において、PRGが、酵素基質である。

【0052】1つの実施形態において、前記A-L-PRGが、分析されるべきサンプル液体に可溶である。

【0053】1つの実施形態において、前記リンカーが切断可能なリンカーである。

【0054】1つの実施形態において、この試薬は、以下の一般式：

【0055】

【化2】

$A-B^1-X^1-(CH_2)_n-[X^2-(CH_2)_m]_x-X^3-(CH_2)_p-X^4-B^2-PRG$

を有し：Aは、親和性標識であり；PRGは、タンパク質反応基であり；そして

【0056】

【化3】

$B1-X1-(CH_2)_n-[X2-(CH_2)_m]_x-X3-(CH_2)_p-X4-B2$

10 は、リンカー基であり、ここで：X1、X2、X3およびX4は、互いに独立して、そしてX2が他のX2と独立して、O、S、NH、NR、NRR' +、CO、COO、COS、S-S、SO、SO2、CO-NR'、CS-NR'、Si-O、アリールまたはジアリール基から選択され得るか、あるいはX1-X4が存在しなくてもよく；B1およびB2は、互いに独立して、COO、CO、CO-NR'、CS-NR'、(CH2)q-CO-NR'、(CH2)q-CS-NR'、または(CH2)qから選択される任意の基であり；n、m、p、qおよびxは、0〜約100の値を取り得る整数であり、ここで、n+xm+p+qが約100未満であり；Rは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシル、または必要に応じて1つまたはそれ以上のアルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアルコキシ基で置換されるアリール基であり；そして、R'は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシル、または必要に応じて1つまたはそれ以上のアルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアルコキシ基で置換されるアリール基であり、ここで、該リンカー中の1つまたはそれ以上のCH2基は、アルキル、アルケニル、アルコキシ基、必要に応じて1つまたはそれ以上のアルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアルコキシ基で置換されるアリール基、酸性基、塩基性基または持続性の正もしくは負の電荷を有する基で必要に応じて置換され得；ここで該リンカー中の非隣接CH2基を連結する1つまたはそれ以上の単結合は、二重または三重結合で置き換えられ得、ここで該リンカー中の1つ以上の原子が安定同位体で置換され得る。

40 【0057】1つの実施形態において、前記親和性標識がビオチンまたは改変ビオチンである。

【0058】1つの実施形態において、前記親和性標識が、1、2-ジオール、グルタチオン、マルトース、ニトリロ三酢酸基、またはオリゴヒスチジンからなる群から選択される。

【0059】1つの実施形態において、前記親和性標識がハプテンである。

【0060】1つの実施形態において、PRGがスルフィドリル反応基である。

50 【0061】1つの実施形態において、PRGがヨードアセチルアミド基、エポキシド、α-ハロアシル基、ニ

トリル、スルホン化アルキル、アリールチオールまたはマレイミドである。

【0062】1つの実施形態において、PRGがアミン反応基、ホモセリンラクトンと反応する基またはカルボン酸基と反応する基である。

【0063】1つの実施形態において、PRGが、アミン反応性ペンタフルオロフェニルエステル基、アミン反応性N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基、スルホニルハライド、イソシナネート、イソチオシアネート、活性エステル、テトラフルオロフェニルエステル、酸ハライド、および酸無水物；ホモセリンラクトン反応性第1アミン基、ならびにカルボン酸反応性アミン、アルコールまたは2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテートからなる群から選択される。

【0064】1つの実施形態において、PRGが酵素に対する基質である。

【0065】1つの実施形態において、PRGが、酵素の欠乏が出生時欠損と関連する該酵素に対する基質である。

【0066】1つの実施形態において、PRGが、酵素の欠乏がリソソーム蓄積病と関連する該酵素に対する基質である。

【0067】1つの実施形態において、PRGが、 β -ガラクトシダーゼ、アセチル- α -D-グルコサミニダーゼ、ヘパルスルファミダーゼ、アセチル-C₆O-A- α -D-グルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼまたはN-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼに対する基質である。

【0068】1つの実施形態において、B1またはB2の少なくとも1つがCO-NR' またはCS-NRである。

【0069】1つの実施形態において、X1およびX4がNH、NR、およびNRR' +から選択され、X3がOであり、そして全てのX2基がOである。

【0070】1つの実施形態において、前記リンカーがジスルフィド基を含む。

【0071】1つの実施形態において、前記リンカーの任意の原子が重同位体で置換され得る。

【0072】別の局面において、本発明は、上記試薬を含む、質量分析計分析によるタンパク質の分析のための試薬キットを提供する。

【0073】1つの実施形態において、このキットは、上記の1つまたはそれ以上の試薬を含む。

【0074】1つの実施形態において、このキットは、親和性タグ化タンパク質の消化における使用のための1つまたはそれ以上のタンパク質分解酵素をさらに含む。

【0075】1つの実施形態において、このキットは、1セットの、実質的に化学的に同一かつ差次的に標識した親和性タグ化試薬を含む。

【0076】1つの実施形態において、前記試薬が親和

性タグ化酵素基質試薬である。

【0077】1つの実施形態において、このキットは、1セットの、実質的に化学的に同一かつ差次的に標識した親和性タグ化酵素基質を含む。

【0078】1つの実施形態において、このキットは、1セットの、実質的に化学的に同一かつ差次的に標識した親和性タグ化酵素生成物をさらに含む。

【0079】

【発明の実施の形態】（発明の詳細な説明）本発明の方法は、親和性タグ化されたタンパク質反応性試薬を使用し、ここで、この親和性タグは、タンパク質反応性基にリンカーによって共有結合される。このリンカーは、実質的に化学的に同一であるが、質量によって区別可能な試薬の対またはセットを作製するために同位体的に標識され得る。例えば、一对の試薬（このうちの1つは、同位体的に重く、そしてこのうちの他方は、同位体的に軽い）は、2つのサンプル（これらのうちの一方は、1種以上の公知のタンパク質を既知の量で含有する参照サンプルであり得る）の比較のために使用され得る。例えば、リンカー中の水素、窒素、酸素またはイオウ原子のうちの任意の1つ以上は、それらの同位体的に安定なアイソトープ：²H、¹³C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸Oまたは³⁴Sと置換され得る。

【0080】適切な親和性タグは、共有的または非共有的のいずれか、および高い親和性で選択的に捕捉試薬

(CR)に結合する。CR-A相互作用または結合は、非特異的結合成分を除去するために、種々の溶液による大規模および多数回、洗浄した後、インタクトなままであるべきである。親和性タグは、CRを除いては、最小限に結合するか、または好ましくはアッセイ系中の成分に全く結合せず、そして反応容器の表面に著しく結合はしない。親和性タグの他の成分または表面との任意の非特異的相互作用は、CR-Aをインタクトにしておく多数回洗浄によって破壊されるべきである。さらに、例えば置換リガンドの添加によってまたは温度または溶媒条件の変化によって、AおよびCRの相互作用を破壊し、ペプチド、基質または反応生成物を放出することは可能でなければならない。好ましくは、CRもAもいずれもこのアッセイ系における他の成分と化学的に反応せず、そして両方の基は、アッセイまたは実験の期間にわたって化学的に安定であるべきである。親和性タグは好ましくは、(MS)ⁿ分析の間、ペプチド様フラグメント化を起こさない。親和性標識は、好ましくは、分析されるべきサンプル液中に可溶性であり、そしてCRは、アガロースのような不溶性樹脂に結合される場合であっても、サンプル溶液中に可溶性のままであるべきである。用語、可溶性CRとは、CRが十分に水和されるかまたは溶媒和され、その結果、これがAに結合するために適切に機能することを意味する。CRまたはCR含有結合体は、Aを捕獲するために添加される場合を除いては、

分析されるべきサンプル中に存在するべきではない。

【0081】AおよびCRの対の例としては以下が挙げられる：d-ビオチンまたは構造的に改変されたビオチンベースの試薬（d-イミノビオチンを含み、これは、アビジン/ストレプトアビジンのタンパク質に結合され、例えば、ストレプトアビジン（streptavidin）-アガロース、オリゴマー-アビジン-アガロース、またはモノマー-アビジン-アガロースの形態で使用され得る）；任意の1, 2-ジオール（例えば、1, 2-ジヒドロキシエタン（HO-CH₂-CH₂-OH））および他の1, 2-ジヒドロキシアルカン（環式アルカンのもの（例えば、1, 2-ジヒドロキシシクロヘキサン）を含み、これは、アルキルまたはアリールのボロン酸またはボロン酸エステル（例えば、フェニル-B（OH）₂またはヘキシル-B（Oエチル）₂）に結合し、これは、アルキルまたはアリール基を介して固体支持体物質（例えば、アガロース）に結合され得る）；マルトース結合タンパク質に結合するマルトース（および任意の他の糖/糖結合タンパク質対またはより一般的には任意のリガンド/リガンド結合タンパク質対（上記で議論される特性を有する））；任意の抗体のためのハプテン（例えば、ジニトロフェニル基）（ここで、ハプテンは、ハプテンを認識する抗ハプテン抗体に結合し、例えば、ジニトロフェニル基は、抗ジニトロフェニル-IgGに結合する）；遷移金属に結合するリガンド（例えば、オリゴマー-ヒスチジンは、Ni（II）に結合し、遷移金属CRは、樹脂結合キレート化遷移金属の形態（例えば、ニトリロ三酢酸-キレート化Ni（II）またはイミノ二酢酸-キレート化Ni（II））で使用され得る）；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合するグルタチオン。

【0082】一般に、上記で議論される適合性基準に合う親和性富化のために任意のA-CR対が通常使用される。ビオチンおよびビオチンベースの親和性タグが好ましい。特に関心があるのは、構造的に改変されたビオチン（例えば、d-イミノビオチン）であり、これは、10～20%の有機溶媒を含有する希釈酸のようなESI-MS分析に適合の溶媒条件下でアビジンまたはストレプトアビジン（streptavidin）カラムから溶出する。d-イミノビオチンタグ化合物がpH4未満の溶媒中で溶出することは予測される。d-イミノビオチンタグタンパク質反応性試薬は、対応するビオチンタグ試薬に関して本明細書中に記載される方法によって合成され得る。

【0083】置換リガンドであるDLは、CRからAを置換するために必要に応じて使用される。適切なDLは、典型的には、添加されなければサンプル中に存在しない。DLは、分析されるべきサンプル中で化学的および酵素的に安定であり、そしてサンプル中の化合物（CR以外）と反応しないか、またはサンプル中の化合物

（CR以外）に結合するべきではないか、あるいは反応容器壁に非特異的に結合するべきではない。DLは、好ましくは、MS分析の間、ペプチド様フラグメント化を起こさず、そしてサンプル中のその存在は、タグ化ペプチド、基質または反応生成物結合体のイオン化を著しく阻止するべきではない。

【0084】DLそれ自体は、好ましくは、質量分析の間、最小限にイオン化され、そしてDLクラスターから構成されるイオンの形成は、好ましくは、最小限である。DLの選択は、使用されるAおよびCRに依存する。一般に、DLは、その添加のせいぜい1週間以内（しかし、より好ましくは、数分以内または1時間まで）で、合理的タイムスケールにおいて、CRからAを置換するために、選択される。CRに関するDLの親和性は、CRに関してAを含有するタグ化合物の親和性よりも匹敵するかまたは強いはずである。さらに、DLは、CRからのAを含有するタグ化合物の溶出の間に使用される溶媒中に可溶性であるべきである。DLは、好ましくは、AあるいはAの誘導体または構造的改変体を含まない。DLの例としては、d-ビオチンまたはd-ビオチン誘導体、特に、MS中のクラスター形成を抑制するかまたはイオン化を抑制する基を含有するd-ビオチン誘導体が挙げられる。

【0085】リンカー基（L）は、分析されるべきサンプル液体中に可溶性であるべきであり、そしてそれは、化学反応に対して安定性（例えば、サンプルの成分ならびにAおよびCR基と、実質的に化学的に不活性）であるべきである。リンカーは、Aに結合する場合、リガンドの置換によってか、あるいは温度または溶媒における変化によって、AのCRとの特異的相互作用を干渉しないか、またはCRからのAの置換を干渉するべきではない。リンカーは、反応容器表面またはCRに対して、その系中の他の成分に、最小限に、または好ましくは少しも、結合するべきではない。リンカーの任意の非特異的相互作用は、多回洗浄の後、破壊されるべきであり、これは、A-CR複合体をインタクトのままにする。リンカーは、好ましくは、（MS）ⁿ分析の間、ペプチド様フラグメント化を起こさない。リンカー基中の原子の少なくともいくつかは、安定な重原子同位体と容易に置換可能であるべきである。リンカーは、好ましくは、親和性タグ試薬、ペプチド、基質または反応生成物のイオン化を容易にする、基あるいは部分を含む。

【0086】イオン化を促進するために、このリンカーは、酸性または塩基性基（例えば、COOH、SO₃H、1級、2級または3級アミノ基、窒素-複素環、エーテル、あるいはこれらの基の組み合わせ）を含み得る。リンカーはまた、永久的電荷（例えば、ホスホニウム基、4級アンモニウム基、スルホニウム基、キレート化金属イオン、テトラアルキル（tetraalkyl）またはテトラアリール（tetraryl）ボレートある

いは安定なカルボアニオン)を有する基を含み得る。

【0087】リンカーのAまたはPRGへの共有結合は、典型的に、アッセイの間、化学的または酵素的反応によって意図的でなく切断されるべきではない。ある場合において、例えば、アフィニティーカラムからの放出を容易にするために、リンカーを、親和性タグAからまたはPRGから切断することは、望ましくあり得る。従って、リンカーは、例えば化学的、熱的または光化学的反応によって、切断可能であり得る。リンカー中の光切断可能な基は、1-(2-ニトロフェニル)-エチル基を含み得る。熱的に不安定なリンカーは、例えば、核酸の2つの相補体ストランドから形成される二重ストランド化二重鎖、ペプチド核酸の相補的ストランドを有する核酸のストランド、または加熱すると解離する2つの相補的ペプチド核酸(nucleic)ストランドであり得る。切断可能リンカーはまた、ジスルフィド結合、酸または塩基不安定性基(とりわけ、ジアリールメチルまたはトリメチルアリールメチル基を含む)、シリルエーテル、カルバメート、オキシエステル、チオエステル(thiester)、チオノエステル、ならびに α -フッ素化アミドおよびエステルを含むものを含む。酵素的に切断可能なリンカーは、例えば、プロテアーゼ感受性アミドまたはエステル、 β -ラクタマーゼ感受性 β -ラクタムアナログおよびリンカー(これはヌクレアーゼ切断可能またはグリコシダーゼ切断可能である)を含み得る。

【0088】タンパク質反応性基(PRГ)は、特定のタンパク質官能性基と選択的に反応するか、または目的の酵素の基質である基であり得る。任意の選択的に反応性のタンパク質反応性基は、サンプル中のタンパク質の少なくとも一部に存在する目的の官能性基と反応すべきである。PRGと、タンパク質上の官能性基との反応は、分析されるべきサンプル中の化合物の実質的な分解へと導かない条件下で、起こるべきである。本発明の親和性タグ化試薬における使用のために適切な、選択的反応性のPRGの例は、システインを含むタグタンパク質に対してスルフィド基と反応するもの、アミノ基、カルボキシレート基、エステル基、ホスフェート反応性基、ならびにアルデヒドおよび/またはケトン反応性基と反応するもの、あるいはCHBrとのフラグメント化の後にホモセリンラクトンと反応するものを含む。

【0089】チオール反応性基としては、エポキシド、 α -ハロアルシル基、ニトリル、スルホン化アルキルまたはアリールチオールおよびマレイミドが挙げられる。アミノ反応性基は、タンパク質中のアミノ基をタグ化し、そしてハロゲン化スルホンル、イソシアネート、イソチオシアネート、活性エステル(テトラフルオロフェニルエステル、およびN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルを含む)、酸ハライド、ならびに酸無水物が挙げられる。さらに、アミノ反応性基としては、 NaBH_4 ま

たは NaCNBH_3 の存在または非存在でのアルデヒドまたはケトンが挙げられる。

【0090】カルボン酸反応性基としては、カップリング剤(例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミドまたは2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート)の存在下での、およびカップリング触媒(例えば、4-ジメチルアミノピリジン)の存在または非存在下での、アミンまたはアルコール;ならびにCu(II)フェナントロリンを含む遷移金属-ジアミン複合体が挙げられる。

【0091】エステル反応性基としてはアミンが挙げられ、これは、例えば、ホモセリンラクトンと反応する。

【0092】ホスフェート反応性基としてはキレート化金属が挙げられ、ここで、この金属は、例えばニトリロ三酢酸またはイミノ二酢酸にキレート化される、例えばFe(III)またはGa(III)である。

【0093】アルデヒドまたはケトン反応性基としてはアミンおよび NaBH_4 または NaCH_2BH_3 、あるいはまず炭水化物を過ヨウ素酸塩で処理した後、アルデヒドまたはケトンを生成するこれらの試薬が挙げられる。

【0094】PRG基はまた、目的の選択された酵素に対する基質であり得る。目的の酵素は、例えば、疾患状態または奇形児に関連する酵素、あるいは医療目的で慣用的にアッセイされる酵素であり得る。本発明の方法を用いて使用するための目的の酵素基質は、酸ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アンギオテンシン転換酵素、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、クレアチンキナーゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、リパーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、およびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(これらは、他の方法によって、現在、慣用的にアッセイされる)が挙げられる。

【0095】A、L、PRGのための上記に議論された必要性は、A-L-PRGのセグメントおよびこの試薬を用いて生成される反応生成物の対応物にまで広がる。

【0096】内部標準(適切に同位体的に標識される)は、サンプル中のタンパク質の絶対的な定量的量を測定するために、本発明の方法において使用され得る。内部標準は、酵素反応の親和性タグ化生成物を定量することを意図するアッセイにおいて特に使用される。この適用において、内部標準は、親和性タグ化酵素基質上の酵素の作用によって生成されるタグ化酵素生成物に化学的に同一であるが、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O または ^{34}S (これらはMS技術によって独立して検出されることが可能である)を含み得る同位体標識を有する。サンプル中の1つまたはいくつかのタンパク質を定量化するための本明細書中の方法における使用のための内部標準は、タグ化タンパク質の消化から生成される親和性タグ化ペプチドを生成するための、親和性標識化タ

ンパク質反応性試薬と公知のタンパク質との反応によって調製される。親和性タグ化ペプチド内部標準は、実質的に、親和性タグ化タンパク質の消化から生成される対応する親和性タグ化ペプチドに実質的に化学的に同一である（これらがMS技術によるそれらの独立的検出を可能にするように差次的に同位体的に標識化されることを除いては）。

【0097】本発明の方法はまた、2つ以上のタンパク質サンプル中の1つ以上のタンパク質（各サンプル中のタンパク質は、実質的に化学的に同一であるが、差次的に同位体的に標識化される、親和性タグ化試薬と、反応される）の相対量を決定するために適用され得る。このサンプルは、組み合わせられ、そして一体としてプロセスされる。そのペプチドが由来するタンパク質の相対量を反映する各タグ化ペプチドの相対量は、質量分析によるそれぞれの同位体ピークの測定によって決定される。

【0098】本発明の方法は、多数の異なるサンプルの分析または比較に適用され得る。本発明の方法によって分析され得るサンプルとしては、細胞ホモジネート；細胞フラクション；生物流体（尿、血液および脳脊髄液を含む）；組織ホモジネート；涙；糞；唾液；洗浄液（例えば、肺または腹膜の洗浄液）；生物学的分子の混合物（タンパク質、脂質、炭水化物および核酸を含む）（細胞または組織ホモジネートの部分または完全フラクション化によって生成される）が挙げられる。

【0099】本発明の方法は、MSおよび（MS）ⁿ法を使用する。種々のMSおよび（MS）ⁿ法が利用可能であり、そしてこれらの方法において使用され得るが、マトリックスアシストレーザー脱離イオン化MS（MALDI/MS）およびエレクトロスプレーイオン化MS（ESI/MS）法が好ましい。

【0100】

【実施例】（定量タンパク質（proteome）分析）本方法は、サンプルタンパク質混合物および参照タンパク質混合物中の定量的タンパク質プロファイル測定のためのビオチン標識化スルフィドヒドリン反応性試薬を使用するスキーム1に概略的に例示される。本方法は、以下の工程を包含する：還元。サンプルおよび参照混合物中のタンパク質のジスルフィド結合は、遊離SH基に還元される。好ましい還元剤は、トリ-n-ブチルホスフィンであり、これは標準条件下で使用される。あるいは、還元剤としては、メルカプトエチルアミンおよびジチオスレイトールが挙げられる。必要ならば、この反応は、タンパク質溶解性を維持するための高濃度の界面活性剤およびウレアを含む可溶性剤の存在下で行われ得る。比較されるべき参照およびサンプルタンパク質混合物は、同じ反応条件を適用して、別個にプロセスされる；SH基の親和性タグを用いる誘導体化。遊離SH基は、ビオチン化試薬であるビオチン-γ-ブチロイルアミジル-4, 7, 10トリオキサトリデカンジアミン

を用いて誘導体化され、この合成は、以下に記載される。この試薬は、安定な同位体によるリンカー原子の置換によって、異なる同位体的に標識化された形態で調製され、そして各サンプルは、この試薬の異なる同位体的に標識化された形態で標識化される。SH基の誘導体化は、好ましくは、僅かに塩基性の条件（pH 8.5）下、室温で90分間行われる。2つのサンプルの定量的比較分析のために、各々1つのサンプル（参照サンプルおよびサンプルと呼ばれる）は、それぞれ、この試薬の同位体的に軽い形態および同位体的に重い形態を用いて、スキーム1に例示されるように誘導体化される。いくつかのサンプルの比較分析のために、1つのサンプルは、他のサンプルが関連するものに対する参照として設計される。典型的に、参照サンプルは、同位体的に重い試薬を用いて標識化され、そして実験サンプルは、この試薬の同位体的に軽い形態を用いて標識化されるが、試薬のこの選択は、任意である。これらの反応はまた、高濃度の可溶性剤の存在と適合性である；標識化サンプルの組み合わせ。親和性タグ化反応の完了後、同位体的に異なる試薬（例えば、重い試薬および軽い試薬）を用いて標識化されたサンプルの定義されたアリコートは、組み合わせられ、そしてすべての引き続く工程は、プールされたサンプルで行われる。この手順の初期段階にて異なつて標識化されたサンプルの組み合わせは、引き続く反応および操作に起因する可変性を排除する。好ましくは、各サンプルの等しい量が組み合わせられる；過剰な親和性タグ化試薬の除去。過剰な試薬は、例えば、タンパク質SH基が完全に誘導体化された後、過剰のSH-含有ビーズをこの反応混合物に添加することによって吸着される。ビーズは、加えられる試薬に対して約5倍モル過剰のSH基を達成するために、この溶液に添加され、そして室温で30分間インキュベートされる。反応後、このビーズは、遠心分離によって除去される；タンパク質消化。サンプル混合物中のタンパク質は、典型的にトリプシンを用いて消化される。代替のプロテアーゼはまた、事実、化学的フラグメント化手順のような、この手順に適合性である。先行工程が高濃度の変性可溶性剤の存在下で行われた場合、このサンプル混合物は、変性濃度が使用されるプロテアーゼの活性と適合性となるまで、希釈される。この工程は、小さなタンパク質の分析においては省略され得る；捕捉試薬との相互作用による親和性タグ化ペプチドの親和性単離。ビオチン化ペプチドは、アビジン-アガロース上で単離される。消化後、ペプチドサンプルのpHは、6.5に下げられ、そしてビオチン化ペプチドはモノマーアビジン（Pierce）でコーティングされたビーズ上に固定される。このビーズは、大規模洗浄される。最後の洗浄溶媒は、残りのSDSを除去するために、10%メタノールを含む。ビオチン化ペプチドは、アビジン-アガロースから、例えば0.3%ギ酸（pH 2）を用いて溶出され

る；データ依存性フラグメント化による μ LC-MSⁿまたはCE-MSⁿによる、単離され、誘導体化されたペプチドの分析。当該分野で周知であり、そして例えばDucretら、1998；FigеysおよびAebersold、1998；Figеysら、1996；またはHaynesら、1998に記載される方法および機器制御プロトコルが使用される。

【0101】この最後の工程において、タンパク質（そこからタグ化ペプチドが由来する）の定量および引き続く同定の両方は、自動化多段階MSによって決定され得る。これは、二重モードの質量分析の操作によって達成され、ここで、これは、キャピラリーカラムから溶出する相対量ペプチドの測定と、選択されたペプチドの配列情報の記録との間の連続スキャンにおいて交替する。ペプチドは、MSモードにおいて、それぞれ試薬の同位体的に軽いまたは重い形態によってタグ化された、（それゆえ、親和性タグ化試薬内のコードされた質量差によって質量に差がある）同一配列のペプチドイオンの対に関して相対シグナル強度を測定することによって定量化される。ペプチド配列情報は、MSⁿモードでの質量分析操作における衝突誘導分離（CID）に関する特定の質量対荷電（ m/z ）比のペプチドイオンを選択することによって自動的に生成される。（Link, A. J. ら（1997）、Gygi, S. P. ら（1999）、およびGygi, S. P. ら（1999））。次いで、得られたCIDスペクトルは、配列データベースと自動的に相関させ、配列決定されたペプチドが由来するタンパク質を同定する。親和性タグ化され、そして差次的に標識化されたペプチドサンプルのMSおよびMSⁿ分析によって作製された結果を組み合わせることによって、従って、単一の自動化操作でのタンパク質混合物の成分の相対量および配列同一性が決定される。

【0102】ビオチン化スルフィドリル試薬を使用する、合成ペプチドサンプルの定量分析への、タンパク質中のペプチドの相対量への、本方法のこの適用の結果は、それぞれ、図1、表1および図2に示されるような誘導体化ペプチドのタンデム質量スペクトル分析を要約する。

【0103】本方法はまた、他の親和性タグおよび他のタンパク質反応性基（アミノ反応性基、カルボキシル反応性基、またはホモセリンラクトンと反応する基を含む）を使用して行われ得る。

【0104】定量的タンパク質分析のための本明細書中で使用されるアプローチは、2つの原理に基づく。第1に、タンパク質からの連続するアミノ酸の短い配列（5〜25の残基）は、このタンパク質を独自に同定するために十分な情報を含む。MSⁿによるタンパク質同定は、高性能コンピュータ検索アルゴリズムを使用して、CID質量スペクトルに含まれる配列情報を、配列データベースと相関させることによって達成される（En

g, J. ら（1994）；Mann, M. ら（1994）；Qin, J. ら（1997）；Clauser, K. R. ら（1995））。第2に、それぞれ軽いおよび重い親和性タグ化試薬でタグ化された同一ペプチドの対（または2つより多くのサンプル、同一タグ化ペプチドのセット（各セットのメンバーは差次的に同位体的に標識化される）において）は、化学的に同一であり、そしてそれゆえ、正確な定量のための相互の内部標準として働く。MS測定は、例えば異なる細胞状態を示す異なるサンプルに由来するペプチド間で容易に区別する。なぜならば、ペプチドに結合される同位体的に別個の試薬間に差異があるからである。ピークのこれらの対またはセットの異なる重量の成分の強度間の比は、ももとの細胞プール中のペプチド（そしてそれゆえ、タンパク質）の相対存在比の正確な測定を提供する。なぜならば、所定のペプチドに対するMS強度応答性は、この試薬の同位体組成に無関係であるからである（De Leenheer, A. P. ら（1992））。同位体的に標識化された内部標準の使用は、定量質量分析法における標準実行であり、そして例えば体液中の薬物および代謝物の正確な定量において利点を大きくすることが開発されてきた（De Leenheer, A. P. ら（1992））。

【0105】本方法の別の例示において、既知であるが異なる濃度の同じ6個のタンパク質からなる2つの混合物が調製され、そして分析された。このタンパク質混合物は標識化され、組み合わせられ、そしてスキーム1に概略的に例示されるように処理された。単離され、タグ化されたペプチドは、定量され、そしてESIイオントラップ質量分析計で単一組み合わせの μ LC-MSおよび μ LC-MSⁿ実験で配列決定された。すべての6個のタンパク質は、明白に同定され、そして正確に計量された（表2）。多数のタグ化ペプチドは、各タンパク質に関して遭遇（encounter）した。6個のタンパク質に関する観察された量と予測された量との間の差は、2%と12%との間の範囲であった。

【0106】本プロセスは、図3A〜Cに単一のペプチド対（single peptide pair）について、さらに例示される。MSモードで操作した質量分析計の単回スキャンを図3Aに示す。親和性タグ化された試薬にコードされた質量差によって特徴付けられた4対のペプチドイオンは、このスキャンにおいて検出され、そして、それらそれぞれの m/z 値と共に示される。示したスキャンは、1.3秒で得られた。1時間のクロマトグラフィー溶出勾配の過程にわたって、1200回を超えるこのようなスキャンを自動的に記録した。図3Bは、それぞれ993.8および977.7の m/z 比を有する、イオン対の周囲の質量スペクトルの拡大図を示す。4つのユニットの同時溶出および検出された質量差によって、同一配列を有する、2電荷の親和性タ

グ化されたペプチドの対としてイオンが潜在的に同定される(8の質量差および2つの1電荷状態)。図3Cは、これら2種について再構成されたイオンクロマトグラムを示す。それぞれのピークの輪郭を積分することによって相対量を決定した。比(軽い/重い)を0.54として決定した(表1)。再構成されたイオンクロマトグラムにおけるピークは、鋸歯状のように見える。なぜなら、毎秒のスキャンにおいて、質量分析計をMSとMSⁿモードとの間で切り替え、選択されたペプチドイオンの配列情報(CID質量スペクトル)を収集した。これらのCIDスペクトルを使用して、タグ化されたペプチドの起源となったタンパク質を同定した。図4Aは、 $m/z=998$ を有するペプチドイオンから記録されたCIDスペクトルを示す(図3Aにおける矢印に注目)。このCIDスペクトルとともにデータベース検索によって、タンパク質をグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(これは、タンパク質の混合物の1メンバーであった)(図4B)と同定した。

【0107】本方法のいくつかの有益な特徴を示す。第1に、少なくとも2つのペプチドを、混合物中の各タンパク質から検出した。従って、定量およびタンパク質同定はともに重複し得る。第2に、同定したペプチドは全て、少なくとも1つのタグ化されたシステイン残基を含んだ。ペプチドにおいて、比較的稀有であるシステイン残基が存在することによって、データベース検索に関するさらに強力な拘束が追加される(Sechi, S. ら、1998)。第3に、システイン含有ペプチドのタグ化および選択的富化(selective enrichment)は、6つのタンパク質の同時消化によって生成されるペプチド混合物が有する複雑性を有意に減少させる。このタンパク質の混合物に関して、この複雑性は、293の強力なトリプシンのペプチドから44のトリプシンのペプチド(少なくとも1つのシステイン残基を含む)まで減少された。第4に、アビジンアフィニティーカラムから溶出されたペプチドサンプルは、 μL C-MSⁿによる分析に直接適合可能である。

【0108】(種々の細胞状態におけるタンパク質発現の定量分析)タンパク質の反応性親和性試薬戦略を、2つの非グルコース抑制状態での酵母(*S. cerevisiae*)における定常状態のタンパク質発現の差異を研究するために適用した(表3)。細胞を、炭素源として2%ガラクトースまたは2%エタノールのいずれかを使用して、対数酵母増殖期から収集した。各細胞状態由来の、 $100\mu\text{g}$ の溶解性酵母タンパク質を、異性体が異なる親和性タグ化された試薬を用いて、独立して標識した。これらの標識されたサンプルを合せ、そして図1に記載される戦略に当てた。サンプルの1/50(各細胞の状態由来のタンパク質、約 $20\mu\text{g}$ 当量)を分析した。

【0109】グルコース抑制によって、他の炭素源で増

殖するに十分な代謝機能によって多数のタンパク質が最低限発現される(Ronn, H (1995; Hodge, P. E. ら(1999)))。グルコースが存在しない、ガラクトースまたはエタノールでの増殖によって、グルコース抑制遺伝子が発現する。表3は、分析中に遭遇した、34の酵母遺伝子の選択を示すが、この表は、同定されたすべて公知のグルコース抑制遺伝子を含む(Mann, M. ら(1994))。これらの遺伝子の各々は、グルコースでの酵母増殖において最小限発現した。ガラクトースでの増殖(GAL1, GAL10)ならびにエタノールにでの増殖(ADH2, ACH1)の両方に特異的な遺伝子を検出および定量した。

【0110】本方法の定量的性質は、相対タンパク質レベルにおける小さな変化を正確に測定する能力において明らかである。測定精度の証拠は、複数のペプチドが定量された、タンパク質の比を研究することによって発見された優良な一致によって見受けられ得る。例えば、PCK1から発見された5つのペプチドは、平均比(mean ratio) $\pm 95\%$ 、 1.57 ± 0.15 の信頼区間を有し、そしてパーセント誤差は、10%未満であった。さらに、観測された変化は、文献(Ronn, H. 1995; Hodge, P. E. ら(1999))から予測される変化に一致する。最終的に、観測された変化は、二次元ゲル電気泳動の後に試験したこれらの同一タンパク質に関する染色強度(データは示さない)における変化と一致する。

【0111】酵母におけるイソチームのアルコールデヒドロゲナーゼファミリーは、六炭糖(ADH1)およびエタノール(ADH2)のいずれも増殖を促進する。遺伝子ADH2は、ともにグルコース抑制され、そしてガラクトース抑制され、TCAサイクル(図5A)に入るアセトアルデヒドへとそれを転換することによって酵母細胞がエタノールで完全に増殖することを可能とする酵素をコードする。糖存在下、ADH1は、アセトアルデヒドをエタノールへと変換する、その逆反応を実施する。これらのイソチームの調節は、酵母における炭素利用にとって重要である(Ronne, H (1995))。イソチームのファミリーにわたる遺伝子発現における差異を正確に測定する能力は、cDNA配列(array)技術を使用して、クロスハイブリダイゼーションが原因で時折困難となる(DeRisi, J. L. ら(1997))。図1に例示されるように適用された本発明の方法は、たとえADH1およびADH2が93%のアミノ酸(88%のヌクレオチド)配列の類似性を共有しても、各イソチームに関する遺伝子発現の測定に成功した。この原因は、各酵素由来の親和性タグ化されたペプチドが単一のアミノ酸残基(バリンとスレオニン)(これは、2分より多くだけ保持時間がシフトし、そしてADH2ペプチドに関して2ダルトンだけ質量がシフトした(図5B))によって区別されるからであっ

た。ガラクトースがエタノールに匹敵する炭素源である場合、ADH1を約2倍の高レベルで発現させた。ADH2発現のエタノール誘発によって、グルコース誘発と比較して200倍より多くの増加が生じた。

【0112】上記の結果は、本発明の方法によって、一回の自動操作で、タンパク質混合物の定量分析およびその中のタンパク質成分の同定が提供されることを示す。

【0113】スルフヒドリル反応剤を使用して適用される本方法は、ペプチド混合物が有する複雑性を有意に減少させる。なぜなら、親和性タグ化されたシステイン含有ペプチドが選択的に単離されるからである。例えば、全酵母タンパク (proteome) (6113タンパク質) の理論的なトリプシン消化によって、344, 855ペプチドが産生されるが、これらのタンパク質のうち30, 619だけがシステイニル残基を含む。従って、この混合物が有する複雑性が減少されると同時に、タンパク質定量および同定がさらに達成される。スルフヒドリル試薬とタンパク質との化学反応は、尿素、ナトリウムドデシルスルフェート (SDS)、塩、ならびに反応性チオール基を含まない他の薬品の存在下で実施され得る。従って、タンパク質は、それらが酵素的に消化されるまで、溶液中に強力な安定化剤と共に維持される。 μ LC-MSⁿ システムの感度はサンプルの質に依存する。特に、通常使用されるタンパク質安定化剤は、MSとの適合性に乏しいか、またはMSと不適合性である。タグ化されたペプチドの親和性精製によって、MSに不適合性の混入物が完全に除去される。低アバンダンスのタンパク質の従来の方法による定量および同定は、大量 (ミリグラム) の出発タンパク質溶解産物を必要とし、そしてこれらの低アバンダンスのタンパク質に関して富化のいくつかの型を包含する。

【0114】上記アッセイは、約100 μ gのタンパク質を使用し、そして分別技術を使用せずに開始する。このために、タンパク質の約1/50を単一の μ LC-MSⁿ 機器で分析した。このシステムは、1ペプチドあたり10~20 fmolの検出限界を有する (Gygi, S. P. ら (1999))。この原因のために、 μ LC-MSⁿ のみを使用する記載のアッセイにおいて、多数のタンパク質が検出される。しかし、本発明の方法は、生化学的、免疫学的または細胞生物学的分別方法のいずれとも適合可能であり、これらの方法によって、混合物の複雑性が減少され、そして低アバンダンスのタンパク質が富化され、同時に、定量が維持される。この方法は、複数のシステインが検出される場合、定量および同定の両方が冗長され得る。親和性タグ化されたペプチドの発現レベルにおける差異を同定する方法の能力に関連したダイナミックレンジが存在し、これは、ペプチド対 (またはセット) に対応するピークの強度、および混合物の全体的な複雑性の両方に依存する。さらに、このダイナミックレンジは、使用する質量分析計のそれぞ

れのタイプによって異なる。本明細書中に記載されるアッセイにおいてイオントラップが使用された。なぜなら、イオントラップの能力は、たとえイオントラップがさらに制限されたダイナミック定量レンジを提供しても、データ依存様式で有効量の配列情報 (数千のタンパク質が潜在的に同定され得る) を収集するからである。イオントラップのダイナミックレンジ (シグナル対ノイズ比に基づく) は、ペプチド対のシグナル強度および混合物の複雑性に依存して変化したが、100倍までの較差が一般的に検出され得、そしてさらに大きな較差が、よりアバンダンスの高いペプチドに関して決定され得る。さらに、100~200倍より多くのタンパク質発現レベルの変化によってさらに、最初の2つの細胞状態の間における表現型の差異に対する主な強力な要因としてこれらのタンパク質を同定する。この方法は、他の官能基に対する反応性を含むとして拡張され得る。低いパーセンテージのタンパク質 (*S. cerevisiae* に対して8%) は、システイニル残基を全く含まず、従って、スルフヒドリル基特異性 (すなわち、チオール特異性) を有する試薬を用いた分析では見逃される。スルフヒドリル基以外の官能基に対する特異性を有する親和性タグ化された試薬によって、また、システインなしのタンパク質が分析に対して感受性となる。

【0115】本発明の方法は、低アバンダンスのタンパク質、ならびに特定の物理化学的特性 (低溶解度、ラージサイズまたはスモールサイズおよび、極端なpH値を含む) を有するタンパク質のクラスの分析に適用され得る。

【0116】この化学および方法のプロトタイプ的な適用は、複合タンパク質サンプルおよび最終的には上記の好ましい用法に従う細胞および組織の全溶解産物の定量的なプロファイルの確立である。これらの試薬に加えて、本発明の方法は、タンパク質発現プロファイルの決定をはるかに越える適用を有する。このような適用には以下が挙げる: アミノ反応性またはスルフヒドリル反応性の異なる同位体で標識された親和性タグ化された試薬の、免疫沈降した (immunoprecipitated) 複合体におけるタンパク質の定量分析のための適用。この技術の好ましい改変において、種々の状態 (例えば、活性化の種々の状態、種々の疾患状態、分化の種々の状態) を抑制する細胞由来のタンパク質複合体は、特異的な試薬、好ましくは抗体を使用して沈降される。沈降した複合体 (precipitated complex) におけるタンパク質は、次いで、誘導体化され、そして上記のように分析される。

【0117】誘発されたタンパク質リン酸化の部位を決定するための、アミノ反応性の、差次的に同位体で標識された親和性タグ化された試薬の適用。この方法の好ましい改変において、精製したタンパク質 (例えば、種々の刺激条件下での細胞由来の免疫沈降したタンパク質)

はフラグメント化され、そして上記のように誘導体化される。ホスホペプチドは、ESI-MS機器のイオン源におけるフラグメンテーションによって、生じたペプチド混合物において同定され、そしてそれらの相対アバンダンスは、実験サンプルのイオンシグナル強度を、含まれる同位体で標識した基準の強度と比較することによって決定される。

【0118】アミノ反応性の差次的に同位体で標識された親和性タグ化された試薬を使用して、N-末端イオンセリンをMSⁿ スペクトルで同定する。この適用の好ましい改変において、分析されるペプチドを、アミノ基に対して特異的である、軽い同位体の試薬 (isotopically light reagent) および重い同位体の試薬 (isotopically heavy reagent) の50:50混合物で誘導体化する。従って、CIDによるペプチドのフラグメンテーションによって、2つのN-末端イオンセリンが生成され、これらは、使用した試薬の種類の質量差によって、質量が正確に異なる。この適用によって、誘導体化したペプチドのアミノ酸配列決定の際の困難が劇的に減少する。

【0119】(細胞および組織における表面タンパク質の定量分析) 細胞外部膜およびその結合したタンパク質 (細胞表面タンパク質) は、外部シグナルを感知し、環境のキューに应答する際に沈降する。細胞表面タンパク質のアバンダンスの変化は、特定の細胞の状態またはその変化する環境に应答する細胞の能力を反映し得る。従って、細胞表面のタンパク質成分の包括的な定量的特徴付けは、マーカータンパク質、または特定の細胞状態に特徴的なマーカータンパク質の型 (constellation) を同定し得るか、あるいは外部刺激に対する細胞応答に関する分子基底 (molecular basis) を説明し得る。実際、多数の細胞表面レセプター (例えば、Her2/neu、erbB、IGF1レセプター、およびEGFレセプター) 発現における変化は発癌が意図されており、そして乳癌に対する現代の免疫学的な治療アプローチは、特異的にHer2/neuレセプターを認識する抗体 (Herceptin、Genentech、Palo Alto, CA) の注入 (infusion) に基づく。

【0120】細胞表面タンパク質はまた、実験的にアクセス可能である。細胞分類、および細胞識別またはパニングなどの方法による特定細胞の分取単離のための診断アッセイは、細胞表面タンパク質に基づく。従って、正常な細胞と疾患 (例えば、癌) 細胞との間の細胞表面タンパク質の種々の分析によって、重要な診断標的または治療標的が同定され得る。癌の診断および治療のための細胞表面タンパク質の重要性が認識されているが、膜タンパク質の分析は困難であった。それらの一般的に低い溶解性に起因して、これらは、標準的な2Dゲル電気

泳動パターンにおいて表される傾向にあり、そして、D2電気泳動条件を膜タンパク質の分離に適応させる試みは、制限した成功を満たす。本発明の方法は、従来技術における原理的な制限を克服し得る。

【0121】膜タンパク質の分析は挑戦である。なぜなら、それらは、高感度分析機器 (例えば、質量分析計) に適合性である条件下において、溶液中に維持することが一般的に困難であるからである。本発明の方法を膜タンパク質の分析に適用することは、膜タンパク質標識および抽出のためのヒトT細胞リンパ腫細胞系統Jurkat、ならびに十分に特徴付けられたヒト前立腺上皮細胞系統P69SV40Tおよび2つのP69SV40T亜系統 (これらは、10の因子によるIGF-1レセプター発現が異なるを使用して例証され、膜タンパク質の定量的な種々の分析を例証する。

【0122】Jurkat細胞は、適切なモデルシステムである。なぜなら、これらの細胞は容易に数多く増殖するからであり、そして種々の刺激および実験条件に应答する細胞表面タンパク質の調節が、Tリンパ球において十分に特徴付けされているからである。市販のビオチン化試薬、またはより一般的な親和性タグ化試薬が用いられ、リシン残基および遊離N-末端を誘導体化する。水溶性ビオチン化試薬 (例えば、スルホ-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) ビオチン)、および細胞表面タンパク質を標識するために広く使用されているアナログ (スルホスクシンイミジル-6- (ビオチンアミド) -ヘキサノエート (Pierce、Rockford、IL)) が使用され得る。NHSエステルと一級アミンとの反応は、中性のpH値およびそれを超すpHが最適であり、そしてDMSOまたはDMFなどの有機溶媒の存在に適合性である。Jurkat細胞由来の細胞表面タンパク質のビオチン化は、pH7.2のPBS緩衝液中で実施される。細胞 (1×10^7) をPBS緩衝液で洗浄して、培養培地から、汚染血清および他のタンパク質を除去する。細胞を 2.5×10^6 細胞/ml に再懸濁し、そして0.5mg/mlのスルホ-NHS-ビオチン (Pierce、Rockford、IL) と30分間室温で反応させる。標識化した細胞を、冷PBSで2度洗浄し、未反応のビオチン化試薬を除去する。ビオチン化した細胞を、1%のTriton X-114を含有するリシン緩衝液中、 5×10^7 細胞/ml で可溶化する。Triton X-114は、30℃で、界面活性相および水相への相分配特性を有する。相分配に続いて、界面活性相を $300 \times g$ の遠心分離によって水相から除去する。相分配は、細胞膜を富化するために使用して以前に成功している。また、この技術は、Jurkat細胞溶解産物からの膜タンパク質を富化するために見出された。Triton相を、50mMの炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH8.5) を使用して1:5 (v/v) に希釈し、そして高純度に改変したブタトリ

ブシンを12.5 ng/mlの濃度で添加し、タンパク質を37℃で一晩かけて消化する。トリプシンをセリンプロテアーゼインヒビターのカクテルの添加によって中和し、そしてトリプシンペプチドを、アビジン親和性クロマトグラフィー技術によって単離する。溶出したペプチドを例えばμLC法によって分離し、そして、例えば、Sequestプログラムを使用して、ペプチド配列データベースを検索することによって同定する。

【0123】SV40T抗原を使用して不朽化したヒトプロテアーゼ上皮細胞株P69SV40Tは十分に特徴付けられている。この細胞株は不死であるが、腫瘍形成性ではなく、そして1型インスリン様増殖因子レセプター(IGF-1R)を、 2×10^4 レセプター/細胞で発現する。M12と呼ばれる亜系統を、雄性の胸腺欠陥ヌードマウスにおいて、逐次継代によってP69SV40Tから誘導した。この細胞株は非常に腫瘍形成性であり、かつ転位性であり、そして1細胞あたり 1.1×10^3 IGF-1Rを発現する。細胞株P69SV40TおよびM12でのIGF-1Rのアバンダンスにおける相対的な差異は、膜タンパク質への適用に適した本発明の方法を使用して定量的に決定され得る。これらの細胞株に関するIGF-1Rの数は既に決定されているので、この十分に特徴付けられたシステムは、本発明の定量的方法の効率を確認するための基準を提供し得る。

【0124】P69SV40T細胞(1×10^7)は、重い同位体のビオチンタグ化されたアミノ反応性試薬を使用してビオチン化され、そしてM12細胞(1×10^7)は、対応する、軽い同位体のアミン反応性ビオチンタグ化されたアミノ反応性試薬を用いてビオチン化される。IGF-1Rを次いで、ヒトIGF-1Rに対する抗原を使用して両方の細胞株の合わせた溶解産物から免疫沈降され、そして免疫沈降したタンパク質の全ての塊をトリプシンで消化する。トリプシンを次いで、例えば、インヒビターの添加によって中和し、そしてタグ化されたペプチドをビオチンアビジンアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。上記に記載されるように、ペプチド定量および同定のためそれぞれLC-MSおよびLC-MS^Nによって、溶出したペプチドを分析する。この実験における定量は、MSにおける選択的イオンモニタリングを使用するオプションによって容易となる。このモードにおいて、IGF-1Rから誘導されると予測される、タグ化されたペプチドイオンの質量のみがモニタリングされるべきである。

【0125】記載した技術は、親の前立腺細胞株(P69SV40T)とM12細胞との間の細胞表面タンパク質の相対アバンダンスにおける差異を比較するために適用され得、これらの細胞表面タンパク質(これらの発現レベルは2つの細胞株において異なり、そして種々の細胞状態が有する特徴であり得る)を検出かつ同定する。本明細書中に記載される方法を使用して、任意の2つ以

上の細胞株における細胞表面タンパク質の一般的な相対的な定量が分析され得、種々の細胞状態のこれらの細胞表面タンパク質特性を検出し、そして同定する。結果は、(適切であれば)1Dまたは2Dゲルなどの手順、または定量ウェスタンブロットを使用し、独立して確認され得、定量結果を確認する。

【0126】細胞表面タンパク質の定量の実験的変動性は、現在入手可能なcDNA配列技術によって達成される定量の精度よりもオンサイドで(considerably)良好であることが期待される。相対的なタンパク質の量および同一性に加えて、この方法はまた、インタクトな生細胞がビオチン化試薬を除外するという推論に基づき、膜内のタンパク質の配向を明らかにするために使用され得る。

【0127】細胞表面タンパク質から誘導体化されたタグ化されたペプチドに対する選択性を高めるための代替の方法が適用され得る。例えば、タグ化された細胞表面タンパク質は、インタクトな細胞上で直接チロシン化され得、タグ化されたペプチドを生成し、これは、議論したように、精製され、そして分析される。さらに、伝統的な細胞膜調製は、細胞表面タンパク質を富化する最初の工程として使用され得る。これらの方法は、タンパク質分解の前に膜タンパク質を単離するために、ダンス型ホモジナイザーおよび一連の密度勾配遠心分離を用いた、穏やかな細胞溶解を包含し得る。この方法は、細胞表面タンパク質が高度に富化された調製物を提供し得る。親和性タグ化されたタンパク質はまた、タンパク質分解の前、ならびにタンパク質分解の後に、親和性クロマトグラフィーによって単離され得る。このクロマトグラフィーは、タンパク質の溶解度を維持するために界面活性剤(例えば、TX-100、NP-40またはTween-20)の存在下で実施され得る。アフィニティークロマトグラフィー工程(インタクトなタンパク質のための工程、およびタグ化されたペプチドフラグメントのための工程)の逐次適用によって、高度の選択性が提供される。これらの代替の方法は、低アバンダンスの膜タンパク質の検出に関して容易に測定可能(scalable)であり、そしてタグ化された、タグ化されたペプチドの相対量は、選択的な富化工程によって維持される。

【0128】本発明の方法の細胞表面タンパク質への適用において、一旦、タグ化されたタンパク質がフラグメント化されると、これらのタグ化されたペプチドは、より可溶性のサンプルから生成したペプチドとは相違なく挙動する。

【0129】(特定のタンパク質群に選択的である、親和性タグ化されたタンパク質反応性試薬の合成)本発明の方法の使用において適切である、例示的な親和性タグ化された薬剤の合成経路をスキーム2~3に示す(ここで、周知の合成技術は、重水素化されていない試薬およ

び重水素化された試薬の合成に使用される)。

【0130】ビオチニル-ヨードアセチルアミジル-4, 7, 10-トリオキサトリデカンジアミン4 (スキーム3) は、それぞれ、ビオチン基、適切な同位体で同位体標識され得る化学的に不活性なスペーサー、およびヨードアセチルアミジル基からなる。このビオチン基は、試薬を使用して誘導体化したペプチドの親和性富化 (affinity enrichment) に使用され、エチレングリコールリンカーは、質量スペクトル分析のために差次的に同位体で標識され、そしてヨードアセチルアミジル基は、スルフヒドリル含有ペプチドに対する試薬の特性を提供する。この試薬は、全ての水素の形態 (軽い同位体の形態)、リンカーにおいて1~20個、好ましくは4~8個の重水素原子を有する形態 (重い同位体の形態) に合成され得る。

【0131】(細胞可溶化物における複数の酵素の速度の分析) 生化学アッセイによる酵素機能のモニタリングは、多数の分析技術 (生成物の分光光度検出、蛍光検出および放射検出を含む) を用いる不可欠な診断ツールである。しかし、現在の方法は、単一のサンプル中のいくつかの酵素を同時にアッセイするのに使用しにくい。生物学的流体中の代謝産物のコレクションを定量化するための質量分光法は、出生時欠損の分析のための有力なアプローチとして現れた (Morrisら、1994) が、この分析技術は、個々の酵素的段階の速度の直接分析のために開発されていない。細胞ホモジネートおよび他の生物学的サンプル中の酵素活性のモニタリングおよび定量化のための、本明細書中に記載される分析方法により、複合反応の同時 (複合) モニタリングが可能になり、そしてこれは容易に自動化され得る。

【0132】酵素アッセイに適用されるような本発明の方法の特徴は、酵素産物および化学的に同一の内部標準 (これらは、安定同位体 (重水素) 標識により識別される) を同時に検出するための、エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) (Coleら、1997) の使用である。第2の特徴は、親和性精製と組み合わせた場合に、粗生体学的流体からの酵素産物の容易な捕捉を提供する、酵素基質を含む親和性標識試薬の使用である。この親和性標識試薬は、リンカーを介して親和性標識に共有結合した、目的の酵素の標的基質を含むように設計される。基質結合における目的の酵素の作用により、その分子量を変化させる開裂または他の改変が起こる (スキーム4)。質量変化は、ESI-MSにより検出される。好ましくは、使用されるリンカーおよび親和性標識は、ESIによるイオン化を容易にし、生物学的流体中の他の酵素の作用を阻害し、そして容易な精製のために複合体マトリクスからの高い選択性の捕捉を可能にする。

【0133】このアプローチの例は、それぞれ、リソソームβ-ガラクトシダーゼおよびN-アセチル-α-D

ーグルコシミニダーゼを同時アッセイするための、親和性標識酵素基質試薬1および2の設計および合成 (スキーム5) である。前者の酵素の不足により、リソソーム蓄積症の1つである、GM1-ガングリオシドーシスが生じ、この状態は約50,000分の1の頻度で母集団において生じ、そして発症した子供の早死をもたらす。N-アセチル-α-D-グルコサミニダーゼの不足により、稀なリソソーム蓄積症であるB型サンフィリポ症候群が生じる。この例は、Gerberら、(1999)、J. Amer. Chem. Soc. 121:1102~1103 (これはその全体が本明細書中で参考として援用される) に記載されている。

【0134】結合体1および2は、親和性標識としてのビオチンからなり、ビオチンはサルコシンに結合される。ビオチンは、アガロースビーズに固定されたストレプトアビジンへの非共有結合によって、基質結合体を、高い特異性で捕捉し得る (Bayerら、1990)。サルコシンは、ビオチンへのN-メチル化アミド結合を提供し、酵素ビオチナーゼ (これはしばしば、細胞流体中に存在し、アッセイ中に結合体分子の開裂を引き起こし得る) を阻害する (Wilburら、1997)。さらに、ビオチニル-サルコシン結合体は、ビオチンの付加によってストレプトアビジンから脱離し得ることが見出された。N-ビオチニルサルコシンブロックは、ポリエーテルジアミンに結合され、このポリエーテルジアミンの長さは、産物と内部標準の質量/電荷重複を避けるように変えられ得る。このリンカーはまた、複数の重水素原子 (すなわち、スキーム5、5における8個の重水素原子および6における4個の重水素) の導入を容易にし、内部標準の合成を可能にし得る。d8-リンカーを、触媒のNaODを含むベンゼン中で、DOCH₂CH₂OCH₂CH₂ODをCD₂dCDCNと反応させることによって作製し (Ashikaga, K.; Ito, S.; Yamamoto, M.; Nishijima, Y. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1988, 61, 2443~2450)、そして得られたジニトリルを、R₂Niでジアミンに還元した。d4-リンカーを、エチレングリコール、CH₃CN中のCD₂dCDCNおよび触媒のNaOHを使用して、同様に作製した。

【0135】さらに、リンカーは親水性であり、基質結合体の良好な水溶性を保証し、そしてこれは、ESIによって効果的にプロトン化される塩基性基を有し、従って、質量分析法による高感度の検出を保証する。標的炭水化物基質は、β-アラニン単位によってポリエーテルリンカーに結合される (スキーム5)。酵素産物結合体3および4をまたスキーム5に示す。結合体1および2を、スキーム5に示されるように調製した。全ての試薬を、逆相HPLCにより均質性になるまで精製し、そして高磁場1H NMRおよびESI-MSによって同定

した。基質は、後者のp-アクリロイルアミドフェニルグリコシドへのマイケル付加によってジアミンスペーサーに結合され(Romanowska et al., 1994)、その中間体は、N-ビオチニルサルコシンのテトラフルオロフェニルエステルと結合された(Wilbur et al., 1997)。

【0136】β-ガラクトシダーゼおよびN-アセチル-R-D-グルコサミニダーゼのESI-MSアッセイは結合グリコシドの酵素的開裂に基づき、モノサッカリド、ならびに結合体3および4(質量差は、それぞれ、162Daおよび203Daである)を放出する。代表的な手順において、0.2mMの1および0.3mMの2を、β-ガラクトシダーゼ欠乏症の別個の患者由来の超音波処理培養した線維芽細胞、および罹患していないヒト由来の培養した線維芽細胞と共にインキュベートした。インキュベーション後、標識化された内部標準5および6を添加し、そしてビオチン化成分をストレプトアビジン-アガロースビーズ上に捕捉した。細胞ホモジネートからの定量的なストレプトアビジン捕捉効率をモデル試薬で観察した。複数回の洗浄により精製して非特異的に結合した成分を除去した後、チオビニル化産物を遊離ビオチンにより放出し、そして溶離液をESI-MSにより分析した。ビオチン化産物の約85%放出が、過剰のビオチンで90分間インキュベートした後に観察された。時間0に存在する全ての成分でアッセイをクエンチすることにより、ブランクを得た。

【0137】代表的な手順において、水(15μL)中の細胞タンパク質(75μg)を、2(0.3mM)および1(0.2mM、細胞タンパク質の添加した5時間後に添加した)を含む15μLの緩衝液(0.1Mクエン酸Na、pH4.25)に添加した。37℃で5.5時間インキュベートした後、この反応を、0.2Mのグリシンカルボン酸緩衝液(200μL、pH10.3)を添加してクエンチし、そして5および6(それぞれ1nmol)を添加した。遠心分離して細胞片を除去した後、上清を、小さな濾過装置(micro Bio Spin, Bio-Rad)中のストレプトアビジン-アルガロース床(7nmolのビオチン結合能力、Pierce)に充填した。5分後、遠心分離により濾過を行い、そしてゲル床を0.1%のTriton X-100(約1分のインキュベーション、次いでスピン)で洗浄し、次いで精製水(Millie-Q, Millipore)で6回洗浄した。56nmolの遊離ビオチン(1~10時間のインキュベーション、次いでスピン)を含む50%メタノール(25μL)で、溶離した。濾液を50%メタノール/水で4倍に希釈し、そして1μLをESI-MSによって分析した。

【0138】ブランクのESI-MSスペクトル(図XA)は、非常に単純であり、これは試薬1および2(m/z 843および840)からの(M+H)⁺イオンの

ピーク、内部標準5および6(m/z 689および641)のピーク、および微量の産物3および4(m/z 681および637)のピークを示す。ビオチンのクラスターによるイオンもまたスペクトル中に現れるが、分析を妨げなかった。ブランク中の非重水素化産物の存在は、サンプルの後処理中の非酵素的基質試薬の加水分解、または気相中の基質イオンの衝突誘導解離が原因であり得る。m/z 843における(結合体1+H)⁺イオンのMS/MSスペクトルは、m/z 681における(結合体3+H)⁺(スペクトルは示されず)の顕著なフラグメントを与える。健康な個体由来の細胞ホモジネートと共にインキュベートしたサンプルのESI-MSスペクトルは、m/z 681において、β-ガラクトシダーゼ産物、そしてm/z 637においてN-アセチル-α-D-グルコサミニダーゼ産物をはっきりと示す(図XB)。健康な患者由来の細胞を使用する3回の酵素反応は、51±3nmol/h(mg細胞タンパク質)のβ-ガラクトシダーゼ比活性、および1.4±0.3nmol/h/mgのN-アセチル-α-D-グルコサミニダーゼ比活性を生じた。時間経過の研究は、初期の反応速度が測定されたことを保証した。6人の健康な個体由来の細胞を用いて得られた値は、β-ガラクトシダーゼの場合、36±4~68±3nmol/h/mgの範囲であり、N-アセチル-α-D-グルコサミニダーゼの場合、0.9±0.05~2.3±0.4nmol/h/mgの範囲であった。反対に、β-ガラクトシダーゼ欠乏症の2人の患者由来の細胞を使用した場合、ブランクレベル(0.9±0.9および0.8±0.6nmol/h/mg)より上の酵素産物は、ほんのわずかしき観察されず、一方、N-アセチル-α-D-グルコサミニダーゼ活性は、はっきりと検出される(図XC)。これらのスペクトルは、0.75μgの細胞タンパク質(約1000個の線維芽細胞に相当する)を用いて得られた。従って、ESI-MS法は、医用用途に非常に高い感度を有する。

【0139】ESI-MSを、Finnigan LC Qイオントラップ機器で行った。データを、1.5μL/分での直接注入によって、m/z 625~875の全スキャンモードで収集した。比活性を、産物対内部標準のイオンピーク面積の比から得た(30回のスキャンを平均化した)。

【0140】基質試薬およびESI-MSを使用して酵素をアッセイするための記載されたアプローチは広く適用され得る。複合技術は、単一の反応における数十個以上の酵素を同時にアッセイするために広がり得、希な障害の診断の確認を助ける複数のアッセイの必要性を排除する。この方法は、特異的な生化学的経路を通る化学的流動の速度を評価する場合に、いくつかの酵素を同時に測定するために、または生化学的なシグナル伝達経路をモニタリングするために、使用され得る。特にビオチン

ーストレプトアビジンが用いられる場合、親和性標識した反応産物および基質を複合体混合物から単離するための親和性標識捕捉試薬方法は、技術的に単純であり、そして容易に自動化され得る。用いられるESI-MS検出が高感度であるため、これはアッセイにつき、サブマイクログラム量の基質試薬を必要とするのみであり、少ないグラムスケールでの数百個の基質試薬の合成が実用的および経済的になる。ほとんどの酵素活性部位は溶媒に曝されているため、酵素活性を維持したまま、親和性標識リンカーをほとんどの酵素基質に結合することが可能である。スキーム6は、この方法における使用に適切なくつかのさらなる酵素基質の構造を提供し、標識結合部位に許容な位置を矢印で示している。さらなる酵素基質に許容な標的部位は、酵素-基質または酵素-基質アナログ構造のX線結晶構造を調べることによって決定され得る。標準的なコンピューターグラフィックプログラムおよび有効なX線データを使用し、そして伸長した鎖のブチル基（親和性標識リンカーのためのモデルとして）を潜在的な標識結合部位に結合することによって、モデル標識とのファンデルワールスオーバーラップ中に酵素原子が存在しないことを示す適切な結合部位が予測され得る。

【0141】上記の方法と類似した方法が、他のサンプリボ症候群（A、CおよびD）と関連する酵素の分析に適用され得る。SFAはヘパンスルファミダーゼと関係し、SFCはアセチル-CoA- α -グルコサミニド（glucosaminide）N-アセチルトランスフェラーゼと関係しそしてSFDはN-アセチルグルコサミン6-スルファターゼと関係する。これらの酵素およびこれらの障害の診断の分析に有用な代表的な親和性標識酵素基質試薬は、以下で提供される。これらの方法はまた、酸スフィンゴミエリナーゼについてアッセイすることによって、A型およびB型ニーマン-ピック病の診断に適用され得、そしてガラクトセレブロシド β -ガラクトシダーゼについてアッセイすることによって、クラッペ病の診断に適用され得る。これらの酵素は、現在、スキーム7に記載されるように、蛍光団誘導体化試薬を使用してアッセイされる。本明細書中の方法でこれらの試薬をアッセイするための酵素基質試薬は、蛍光団を本明細書中のA-L基で置換することによって容易に調製され得る。親和性標識酵素基質を調製するためのこのアプローチは、一般に、任意の公知の蛍光団誘導体化酵素基質または基質アナログに適用可能である。

【0142】表4は、特定の出生児欠損または疾患状態に関連する代表的な酵素を示す。これらの酵素は、本明細書中に記載される方法によってアッセイされ得る。

【0143】（炭水化物-欠乏性糖蛋白質症候群（CDGS）についての酵素的経路のアッセイ）本発明の方法および試薬は、CDGS疾患の診断に適切な複数の酵素の速度を定量化するために用いられ得る。

【0144】Ia型およびIb型CDGSは、酵素、ホスホマンノイソメラーゼ（PMIb）（Ib型）およびホスホマンノムターゼ（PMM2）（Ia型）（これらは、グルコースからマンノース-1-ホスフェートへの変換のための多段階経路（スキーム8）（Freeze, 1998）の一部である）の不足または欠如によって生じる。この経路に関与する単糖類基質は、フルクトース-6-ホスフェート、マンノース-6-ホスフェート、およびマンノース-1-ホスフェートである。これらの単糖類は、基質結合体に変換することがいくぶん困難であり得る。なぜなら、糖上のどの原子が、酵素活性を損なうことなくリンカーと結合するかべきが推測的に明らかではないからである。しかし、PMIbおよびPMM2は、間接的にアッセイされ得る。哺乳動物細胞のミクロソームは、ドリコール-P-マンノースシンターゼを含み、このドリコール-P-マンノースシンターゼは、ドリコールホスフェートとGDP-マンノースとの反応を触媒してドリコール-P-マンノースおよびGDPを形成する（スキーム8, Chapmanら, 1980）。このシンターゼは、本発明の方法を使用し、特にビオチン-リンカー基質を使用してアッセイされ得る。微生物PMM、およびGTPとマンノース-1-PからGDP-マンノースを作製する酵素である、GDP-マンノーススピロホスホリラーゼは、細菌および酵母から容易に精製され（Glaser, 1966, Preiss, 1966）、そしてこれらの酵素は、外因的に酵素アッセイに供給され得る。PMIb活性が不十分である場合、マンノース-6-Pはほとんどまたは全く作られず、その場合、この反応順序は、フルクトース-6-Pの添加によって開始される。マンノース-6-Pがない場合、マンノース-1-PおよびGDP-マンノースは作られず、その結果、結合したドリコール-P-マンノースはESI-MSで検出されない。外因性GTPは、必要ならば、GDP-マンノーススピロホスホリラーゼ工程に供給され、そしてATPは省かれ、その結果、マンノース-6-Pはマンノースからは作られ得ない。PMM2をアッセイするために、反応順序はマンノース-6-Pで開始され、そしてPMM2の欠乏の結果として、結合したドリコール-P-マンノースは作られない。

【0145】キャリアドリコールは、約60~105炭素イソプレノイドである。ドリコール鎖に結合した炭水化物で作用する多くの酵素は、ドリコール鎖の有意な短縮に対して耐性である；10および15炭素ドリコールでさえ耐性である、という証拠が集められている（RushおよびWachter, 1995）。このような酵素は、ドリコール結合体の水溶性炭水化物部分で作用し、従ってドリコールアンカーを結合する必要性はほとんどまたは全くないようである。このことに基づいて、ドリコール-P-マンノースシンターゼの直接アッセイ、ならびにPMIbおよびPMM2の関節アッセイの

ための親和性標識基質は、親和性標識リンカーをショートドリコール（例えば、10-炭素ドリコールアナログのシトロネロール）の非極性末端に結合することによって調製される。

【0146】サルコシニルリンカーを含有するビオチン化ドリコール₁₀-基質結合体(B-S-Dol₁₀-P)の合成は、スキーム9に示される。保護されたシトロネロール(R=t-BuSiMe₂)は、末端アリルメチル基で位置選択的に酸化され(McMurryおよびKocovsky, 1984)、そしてアリルアルコールはビオチンサルコシニル活性エステル(R=CH₃)と結合される。シトロネロールの1-ヒドロキシ基は、POCl₃で連続的に脱保護およびリン酸化される(RushおよびWachter, 1995)。パラレル合成において、ds-サルコシン(CD₃NHCD₂DOH)は、内部標準として使用するため同位体標識

(重)試薬を調製するために使用される。ds-サルコシンは、市販の物質(BrCD₂COODおよびCD₃NH₂)から、標準的な合成技術を使用して容易に調製される。

【0147】重水素化内部標準である、B-ds-S-Dol₁₀-P-マンノースは、雌鳥の卵管ミクロソームを、GDP-マンノースおよび合成B-ds-S-Dol₁₀-P基質結合体と共にインキュベートすることによって酵素的に合成される(RushおよびWeachler, 1995)。B-S-結合体のさらなる利点は、アガロースストレプトアビジンビーズ上での特異的な捕捉、続いて遊離ビオチンでの溶離によって、ミクロソームのマンノシル化産物の親和性精製が容易になり得ることである。

【0148】親和性標識ショートドリコールアナログを使用する方法は、一般に、炭水化物に固定されたドリコールで作用する他の酵素をアッセイするのに適用可能である。このようなアプローチは、まだ同定されていない他のタイプのCDGS中に存在する酵素欠乏症の後に続く同定に有用である。

【0149】II型CDGSは欠陥のあるGlcNAcトランスフェラーゼII(GlcNAc-T II)から生じ、このGlcNAcトランスフェラーゼIIは、ジシアロー2アンテナ(biantennary)鎖の構築プロセス中、GlcNAcを、中間体の分枝オリゴ糖中のUDP-GlcNAcからマンノース残基の2位(コア領域(Core Region)に移動させる(スキーム10)(Schachter, 1986, Brockhausenら, 1989)。GlcNAcトランスフェラーゼIIは、コア領域中のマンノース残基の高い位置特異的なグリコシル化を媒介する6種の公知の酵素のうちの1つである。コア領域は、還元末端でチトビオシルアスパラギンに固定され、ここでアスパラギン残基は、グリコシル化タンパク質のペプチド鎖の一部

である。基質中の後者の構造単位は、酵素活性を損失することなく、疎水性鎖によって置換され得る(Kaurら, 1991)。従って、II型CDGSのための基質結合体は、親和性標識リンカー基をチトビオシルアスパラギンの還元末端(reducing end)に結合され、ここで、アスパラギン残基は、グリコシル化タンパク質のペプチド鎖の一部である。基質における後者の構造ユニットは、酵素活性を損失することなく、疎水性基によって置換され得る(Kaurら, 1991)。従って、II型CDGSの基質結合体は、親和性標識リンカー基をチトビオシルアスパラギンの還元末端に結合することによって構築される。しかし、この基質の後者の構造単位は、酵素活性を損失することなく、疎水性鎖によって置換され得る(Kaurら, 1991)。例えば、市販のα-D-マンノ-ピラノシルフェニルイソチオシアネートは、ビオチン-標識リンカーに結合され得、そして5, 6-ヒドロキシルは、スキーム11に例示されるように選択的に保護される(PaulsenおよびMeinjohnns, 1992)。エクアトリアルな3-OHとペル-O-アセチルマンノシル-1-トリクロロアセトアミデート(amidate)の結合(Paulsenら, 1993)は、二糖類結合体を与える(スキーム12)。少量の結合がアキシアルな2-OH基で起こる場合、その生成物はHPLCで分離され得る。脱保護の後、1級6-OHは、1/2当量のペル-O-アセチルマンノシル-1-トリクロロアセトアミドと結合し、コア領域結合体が生成する。O-アセチル基の脱保護により、GlcNAcトランスフェラーゼIのための基質結合体が生じ、このGlcNAcトランスフェラーゼIは、Triton X-100 ウサギ肝臓抽出物を使用する酵素的グリコシル移動によって、GlcNAc-T II基質に変換され得、この反応は、調製用スケールで行われた(Kaurら, 1981)。

【0150】内部標識に必要な重水素標識した誘導体の合成は、標識PEG-ジアミンビルディングブロックを使用することによって、並行して行われる(Gerberら, 1999)。ビオチン化三糖類は、UDP-GlcNAcおよびトランスフェラーゼIIと共にインキュベートし(KaurおよびHindsgaul, 1991, Tanら, 1996)、そして酵素産物の親和性精製用のB-Sハンドルを利用することによって、四糖類(GlcNAc-T IIの産物)に変換される。

【0151】(V型CDGS)グリコシル化タンパク質のAsn残基に転移される脂質結合オリゴ糖(LLO)は、2個のGlcNAc、9個のマンノースおよび3個のグルコースからなる。最近、V型CDGS患者由来のミクロソームは、LLO生合成の間、1つ以上のグルコース残基を転移させる酵素が非常に欠乏しているということが示された(Kornerら, 1998)。LLOの炭水化物単位をAsn残基に結合するトランスフェラ

ーゼは、グルコース欠乏LLOを識別するため、V型CDGS患者は、糖タンパク質（例えば、トランスフェリン）に結合した少数の炭水化物単位を有する（Kornerrら、1998）。しかし、存在する少数の炭水化物単位は全長であり、これは残りのグリコシル転移は、V型CDGS患者において起こることを示す（Kornerrら、1998）。従って、ESI-MSによるAsnグリコシル化の速度の定量化は、V型CDGS症候群の実行可能なアッセイを構成する。

【0152】Asn-Xaa-Ser/Thr配列を含む、3-7アミノ酸残基を有する合成ペプチドは、グリコシル化に良好な基質であることが示された（Roninら、1981）。オリゴ糖トランスフェラーゼのESI-MSアッセイのための戦略は、Asn-Xaa-Ser/Thr配列を含む適切なペプチドのB-S結合体に依存する（スキーム13）。ヘプタペプチド、NH₂-Tyr-Gln-Ser-Asn-Ser-Thr-Met-NH₂は、以前の研究において高い活性を示した（Roninら、1981）。ペプチドは、社内の自動合成装置を使用する標準的なペプチド合成によって容易に入手可能である。ヘプタペプチドおよびその糖結合体は、ESIによってイオン化され、安定な一価のイオンを与え得る。B-S-テトラフルオロフェニルエステルとNH₂-Tyr-Gln-Ser-Asn-Ser-Thr-Met-NH₂との結合により、このトランスフェラーゼの基質が直接得られる。いくつかの産物は、オリゴ糖アンテナの酵素的グリコシル化および続く改変から予想される。この産物は、甲状腺のラフ（rough）ミクロソームを、B-S-Tyr-Gln-Ser-Asn-Ser-Thr-Met-NH₂およびDol-P-Gluと共にインキュベートし（Roninら、1981a）、続いてビオチン化産物を親和性精製することによって、酵素的に調製され得る。グリコシル化の程度の違いによる産物の分布は、ESI-MSによってモニタリングされ得、主成分はHPLCによって精製され得る。B-N(CD₃)CD₂CO-結合体を使用する類似の手順が、重水素化内部標準を調製するために使用される。

【0153】Ia、Ib、IIおよびV型CDGS症候群についてアッセイされた酵素のセットのための、イオン化された基質結合体、ならびに産物および内部標準の分子量は、表5に集められ、これは(M+H)⁺種の中で電荷の重なり(isobaric overlap)は起こらないことを示す。Ia、b型産物の(M+N_a)⁺イオンと脱マンノシル化B-(N-C₂D₅)-2,2-D₂-Gly-Dol₁₀-P内部標準の(M+H)⁺イオンとの間の接近した間隔は、Na⁺イオンの付加によりNa付加体として気相イオンを生成することにより、ESI-MS条件を調節することによって、容易に回避され得る。

【0154】単一の生物学的サンプル（例えば、細胞溶解産物）において、3つの標的酵素の全てが同時に分析され得る。PMM2およびPMIbは同時にアッセイされ得ない。なぜなら、これらは異なる外因性基質の添加を必要とするからである。それにもかかわらず、同一のESI-MS技術を使用する2つのアッセイが、一連の種々の方法に依存する代わりに、様々なCDGS型を診断するために使用され得る。

【0155】（臨床酵素学的アッセイ）線維芽細胞ペレットを氷上で解凍する。十分な0.9%NaClを添加して、溶解産物中の最終タンパク質濃度が約5mg/mL（典型的には、100mL）を得、そしてこの細胞ペレットを、氷水中で5回、適度な電力で、それぞれ2秒間超音波処理する。全タンパク質を、BCA試薬（BCA Protein Assayキット、Pierce）を使用して分光光学的に決定した。

【0156】全酵素反応容量は、20~30mLである。基質ストック溶液は、3mM(SFB)および2mM(GM1)の濃度に維持する。これらの濃度は、1H-NMRシグナルの積分比対内部標準(DMFのホルムアミドプロトン)により測定した。基質の最終濃度は、それぞれ、0.3mMおよび0.2mMである。20~30mL-(基質の追加分(2~3mL)+(50~70mcgの全タンパク質に等しくなるのに十分な細胞サンプル容量))に等しい容量の反応緩衝液（例えば、200mMのクエン酸ナトリウム、pH4.5）を、0.5mLエッペンドルフチューブに添加し、続いて基質を添加する。サンプルを氷で冷却し、そして患者の細胞サンプルを添加する。この反応を、37℃でインキュベートすることによって開始する。

【0157】SFBについて：この反応系を、4.5~6時間進行させ、この後、GM1基質を添加し得るか、またはこの反応は、100mLの200mMグリシンカルボン酸緩衝液(pH10.5)でクエンチし得る。

【0158】GM1について：この反応を0.5時間進行させる。SFBの場合と同様にクエンチする。

【0159】クエンチした後、これらのサンプルを氷上に置く。内部標準を添加する（それぞれ1nmol、すなわち50mLの0.02mM溶液）。これらのサンプルを、約15,000rpm、2分間、室温で、ペレット細胞片に対して微量遠心する。ストレプトアビジン-アガロースビーズ(Immunopure immobilized streptavidin, Pierce)を、マイクロバイオスピクロマトグラフィーカラム(Bio-Rad)に入れる。十分なビーズを添加して5nmolの全ビオチン結合能力のビーズ（典型的な結合能力は、Pierceにより決定した場合、100pmol/mL）を得る。サンプルの上清をバイオスピチューブに移し、そして室温で10分間結合させる。このサンプルを約3,000rpmでスピンして、

過剰の上清を除去し、次いで、0.01% Triton X-100で1回、精製水で少なくとも5回洗浄し、中程度にチューブをスピニングして溶液を除去する。それぞれ洗浄するために、十分な洗浄溶液を添加して、バイオスピントチューブを満たす。

【0160】次いで、精製ビーズを30mLの精製水で処理し、続いて、10mLの4mMビオチン溶液で処理する。これらのチューブの底をキャップして、漏れを防ぎ、そして2~8℃で2~12時間インキュベートさせる。これらのサンプルを、約3,000rpmでスピニングして、サンプルをきれいなエプENDORFチューブに溶離する。

【0161】次いで、サンプルを、60mLの50%メタノール/水で希釈し、そしてイオントラップ質量分光計に注入する。ESI-MSスペクトルを調整して、まずブランクサンプル（反応をクエンチした後に添加される細胞溶解物）を分析することによって、サンプルの非特異的な切断を減らす。注入したサンプルを、産物および内部標準の(M+H)+イオンについて、1amu幅のウインドーのイオンクロマトグラムの積分によって分析する。

【0162】結果を、形成された生成物nmol/インキュベーションの時間/反応混合物中の全タンパク質ミログラムで報告する。

【0163】(GM1およびSFBについての、患者サンプルの臨床的分析) 患者皮膚線維芽細胞を、凍結ペレットとして得、そして使用まで-20℃で保存した。GM1罹患した2つのサンプルおよび6つの正常なコントロールを分析した。

【0164】50mLの0.9% NaClを、各患者細胞ペレットへ添加した。これらのペレットを、氷水中、各中程度の超音波パワーで2秒間×5回超音波処理によって溶解させ、超音波処理の間において氷水中でマイクロチップを冷凍した。

【0165】サンプルを、以下のようにBCA (Pierce) アッセイによって定量した：試薬AおよびBを、上述のように50:1の比で混合した。タンパク質標準曲線を、ウシ血清アルブミンを、標準として、2、1、0.5、0.2、および0.05mg/mLの濃度で使用して調製した。患者超音波処理物の一部を、水中1:15で希釈し、そして各希釈した親サンプルの5mLおよび標準曲線ポイントを、2連で、200mLの水を含む個々のガラス培養チューブへ添加した。次いで、これらのサンプルを、1mLの混合BCA試薬で希

釈し、ボルテックスして混合し、そして37℃で60分間インキュベートした。これらのサンプルを、室温まで冷却し、そして200mLの水のみを含有するブランクに対して分析した。これらのサンプルを、ポリスチレンキュベット中、562nmでの吸光度をモニターすることによって分析した。平均患者吸光度値を、ブランク補正し(blank corrected)、そして線形回帰によって標準と比較した。

【0166】患者タンパク質濃度は、以下であると測定された：1. (罹患) 12.2mg/mL、2. (正常) 10.8mg/mL、3. (正常) 11.9mg/mL、4. (正常) 12.1mg/mL、5. (正常) 10.3mg/mL、6. (正常) 7.79mg/mL、7. (正常) 15.7mg/mL、8. (罹患) 11.4mg/mL。

【0167】インキュベーションを、総計30mLの総容量で実施した。ブランクEppendorf管へ添加した反応緩衝液(200mM クエン酸ナトリウム、pH4.25)の量は、基質容量(3mLの各基質ストック溶液、GM1について2mMおよびSFBについて3mM、6mLの総量)+75mcgの総タンパク質に等しくなるために要求される細胞溶解物の容量の、30mLからの、差であった。例えば、患者1.のインキュベーション混合物は、最初に3mLのSFB基質溶液、6.14mLの患者細胞溶解物、および17.86mLの反応緩衝液を含んだ。GM1基質を、後で、このインキュベーションに添加した(以下を参照のこと)。

【0168】各患者サンプルを、3連で分析した。反応混合物を、調製の間、氷上に維持し、そしてこの反応を37℃の水浴へ移すことによって開始した。5.5時間インキュベーションし、3mLのGM1基質を、各反応物に添加し、そしてさらに0.5時間後、これらの反応物を、氷上に配置し、そして200mLの200mMグリシン-カーボネート緩衝液(pH10.25)でクエンチした。

【0169】精製手順および分析手順は、Clinical Enzymology Assay (Typical)に記載の通りである。

【0170】得られた酵素活性は、平均標準偏差nmol生成物/時間インキュベーション/mg全タンパク質である：

【0171】

【化4】

45

46

	B-Gal		SFB	
	速度	+/- SD	速度	+/- SD
正株				
患者 2	68.0	2.6	0.90	0.05
患者 3	35.5	3.9	1.54	0.38
患者 4	51.1	2.7	1.36	0.26
患者 5	38.8	8.3	1.01	0.12
患者 6	51.4	9.9	2.25	0.36
患者 7	40.9	3.7	1.12	0.20
罹患者				
GM ₁ (#1)	0.9	0.9	0.80	0.21
GM ₁ (#8)	0.8	0.6	0.70	0.20

以下の合成方法は、スキーム14～23を言及する。GM1-ガングリオシド-シス(β-D-ガングリオシド欠乏)についての合成。

【0172】(1. 2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート(1)) 25 g (0.15 mol)の2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェノール、35 mL (0.2 mol)の無水トリフルオロ酢酸および0.5 mLの三フッ化ホウ素エーテラートを、アルゴン下で、18時間還流した。無水トリフルオロ酢酸およびトリフルオロ酢酸を、室温での蒸留によって除去した。この無水トリフルオロ酢酸の画分を、この混合物に戻し、そしてこの反応系を24時間還流した。これを、2回繰り返した。室温での最後の蒸留の後、所望の生成物1を、減圧下(62℃/45 mmHg)で蒸留し、無色液体(30 g、82%)が生成した。1H-NMR. (Gamper, H. B., Nucl. Acids Res., 第21巻 第145～第150頁を参照)。

【0173】(2. ビオチン-2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェニルエステル(2)) 20 mLの無水DMF中の2.5 g (10.3 mmol)量のd-ビオチンを、アルゴン雰囲気下で、攪拌しながら60℃まで加熱して、溶解した。1.7 mL (12.5 mmol)のトリエチルアミン、続いて3.4 g (12.5 mmol)の1を添加した。この混合物を、2時間攪拌し、その後、溶媒をロータリーエバポレーションによって除去した。得られた半固体を、15 mLのエーテルで2回粉末化し、白色固体を生成した(2.6 g、65%)。1H-NMR. (Wilbur, D. S., Bioconj. Chem., 第8巻、第572～第584頁を参照)。

【0174】(3. N-メチルグリシルビオチンアミド-メチルエステル(3)) 30 mLの無水DMF中の2.5 g (6.4 mmol)量のビオチンテトラフルオロフェニルエステルを、アルゴン雰囲気下で、10 mLの無水DMFおよび1.25 mL (9.0 mmol)のトリエチルアミン中に溶解した1.1 g (7.7 mmol)のN-メチルグリシンメチルエステルヒドロクロリドの混合物へ添加した。この反応混合物を、室温で2時

間攪拌し、次いで、溶媒をロータリーエバポレーションによって除去した。残渣をクロロホルム(2×100 mL)で抽出し、水(2×20 mL)で洗浄し、そして無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を、真空下で除去し、N-メチルグリシルビオチンアミドのメチルエステルをオイルとして得た(2.1 g、98%)。1H-NMR. (Wilbur, D. S., Bioconj. Chem., 第8巻、第572～第584頁を参照)。

【0175】(4. N-メチルグリシルビオチンアミド酸(4)) N-メチルグリシルビオチンアミドメチルエステルを、1時間攪拌しながら室温で、31 mLのMeOHおよび10 mLの1N NaOHの混合液中で加水分解した。この混合物を、50 mL 50% MeOH/水で希釈し、そして陽イオン交換樹脂水素型(hydrogen form)(AG MP-50, BioRad)で中和した。この溶液を濾過し、この樹脂を50% MeOH/水で洗浄し(3×50 mL)、そして溶媒をロータリーエバポレーションによって除去して、N-メチルグリシルビオチンアミド酸をオフホワイト固体として得た(1.6 g、90%)。1H-NMR. (Wilbur, D. S., Bioconj. Chem., 第8巻、第572～第584頁を参照)。

【0176】(5. p-アクリルアミドフェニル-D-ガラクトピラノシド(5)) 40 mg (0.15 mmol)のp-アミノフェニル-D-ガラクトピラノシドを、攪拌しながら、25 mLのメタノールおよび200 mLのトリエチルアミンに添加した。この溶液を、氷浴中で冷凍した。53.3 mg (0.6 mmol)のアクリロイルクロリドを、5 mLの乾燥塩化メレンへ溶解し、そしてこの攪拌溶液へ5分間にわたって滴下した。この反応系を、室温に戻し、続いて2時間攪拌した。次いで、この溶液を、中性pHが湿性pH紙(moist pH paper)で得られるまで、連続の陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂(それぞれ、AG MP-1およびAG MP-50, BioRad)で処理した。溶媒をロータリーエバポレーションによって除去し、固体を得た(43 mg、90%)。1H-NMR. (Romanowska, A., Methods Enzymol., 第242巻、第90～第1

01頁を参照)。

【0177】(6. 4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミンおよび5のマイケル付加生成物(6)) 20mg (0. 07mmol) の5を、5mLの0. 2M炭酸ナトリウム中の80mg (0. 35mmol) の4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミンの攪拌溶液(pH10. 5, 37℃)へ添加した。この反応を、3日間進行させ、この後、この溶液を希トリフルオロ酢酸で中和し、そして逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケール(prepscale) カラム、6mL/分、移動相: H₂O (0. 08%TFA) /ACN (0. 08%TFA)) によって精製し、7. 3mgの生成物を得た。(Romanowska, A. , Methods Enzymol. , 第242巻、第90~第101頁を参照)。

【0178】(7. 4および6のGM1基質結合体(7)) 2. 5mg (7. 4μmol) 量の4を、1. 5mLの無水DMFに、アルゴン雰囲気下で、攪拌しながら溶解した。5mLのトリエチルアミン、続いて2. 3mg (8. 8μmol) の1を添加した。活性エステルの形成を、シリカTLC (5:1 CHCl₃ /CH₃ OH, Rf0. 5, UV) によって、スポットしたTLCプレートを空気流で簡単に乾燥することによってモニターした。25分後、この混合物を、1mLの無水DMF中の3. 2mg (5. 9μmol) の6へ添加した。2時間後、溶媒を真空遠心分離によって除去し、そして最終生成物を逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0. 08%TFA) /ACN (0. 08%TFA)) によって精製した。収量4. 6mg。(Anal ogous chemistry, Wilbur, D. S. , Bioconj. Chem. , 第8巻、第572~第584頁を参照)。

【0179】(8. 1, 2, 10, 11-オクタジューテロ(octadeutero)-3, 6, 9-トリオキサー-1, 11-ウンデカンジニトリル(8)) 1g (9. 4μmol) のジエチレングリコールを、窒素雰囲気下、10mLの丸底フラスコ中で、2mLのD₂Oに溶解した。D₂Oをロータリーエバポレーションによって除去し、そしてこのプロセスを4回繰り返した。d-2ジエチレングリコールを、25mLの乾燥ベンゼンと共に添加し、続いて1. 6g (28. 2μmol) のd-3アクリロニトリルを、攪拌しながら、アルゴン雰囲気下で添加した。12時間後、この溶媒を減圧下で除去し、そして得られた半個体を、クロロホルム(2×25mL)で抽出した。溶媒をロータリーエバポレーションによって除去し、生成物を得た(1. 85g, 89%)。(Ashikaga, K. , Bull. Chem. Soc. Jpn. , 第61巻、第2443~第2450頁を参照)。

【0180】(9. 2, 3, 11, 12-オクタジューテロ-4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミン(9)) ラネーニッケル(Aldrich)を、無水メタノールで、反転およびデカンテーションによって、5回洗浄した。50mgのこの洗浄した触媒を、20mLの無水メタノール中に静置し、続いてテフロン(登録商標)ラインゴム隔壁(Teflon-lined rubber septum)を取り付けた50mLのスクリュキャップバイアル中で1g (4. 6mmol) の8中に静置した。このバイアルのヘッドスペースを、数分間、この隔壁を貫通する18ゲージ針を介して、H₂でフラッシュした。このキャップを密接にネジで締め、そしてこの全体のアセンブリを、40psi H₂まで充填し、4時間、熱水浴(80℃)中に配置し、その後、この固体触媒を、濾過によって除去し、そしてメタノールをエバポレートした。この最終生成物を逆相HPLC (Vydac C-18分取スケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0. 08%TFA) /ACN (0. 08%TFA)) によって精製した。収量180mg。(Ashikaga, K. , Bull. Chem. Soc. Jpn. , 第61巻、第2443~第2450頁を参照)。

【0181】(10. 6の重水素化アナログ(10)) 25mg (0. 09mmol) の5を、5mLの0. 2M炭酸ナトリウム中の90mg (0. 04mmol) の9の攪拌溶液(pH10. 5, 37℃)へ添加した。この反応を、3日間進行させ、この後、この溶液を希トリフルオロ酢酸で中和し、そして逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0. 08%TFA) /ACN (0. 08%TFA)) によって精製した。収量6mg。

【0182】(11. 7の重水素化アナログ(11)) 3mg (8. 4μmol) 量の4を、アルゴン雰囲気下で、攪拌しながら、0. 7mLの無水DMFに溶解した。5mLのトリエチルアミン、続いて2. 4mg (8. 9μmol) の1を添加した。活性エステルの形成を、シリカTLC (5:1 CHCl₃ /CH₃ OH, Rf0. 5, UV) によって、スポットしたTLCプレートを空気流で簡単に乾燥することによってモニターした。25分後、この混合物を、1mLの無水DMF中の6mg (11μmol) の10に添加した。2時間後、この溶媒を、真空遠心分離によって除去し、そして最終生成物を、逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0. 08%TFA) /ACN (0. 08%TFA)) によって精製した。収量1. 8mg。

【0183】(12. GM1内部標準結合体(12)) 1. 8mgの11を、攪拌しながら、2mLの100mM Tris/10mM MgCl₂、pH2. 3緩衝液へ添加した。15ユニット組換え-D-ガラクトシ

ダーゼ (Sigma) を添加し、そして12時間後、この混合物を、逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0.08% TFA) / ACN (0.08% TFA)) によって精製した。収量1.5mg。

【0184】 (ポリエテルジアミンリンカー合成 (第2生成)) 合成は、以前に記載された化学 (Katak, R. ら、J CHEM SOC PERK T 2 (2) 321-327 FEB 1990) に基づき、少しの改変および追加の2工程を伴う。例として、
10 確立された手順からの逸脱、ならびに追加の工程についての正確な細部を、出発物質のジエチレングリコールについて以下に概要を述べる。

【0185】 (1, 11-ジシアノ-3, 6, 9-トリオキサウンデカン (13)) 2% (w/v) 水酸化ナトリウム (5mL) およびジエチレングリコール (5.3g, 50mmol) の攪拌溶液へ、アクリロニトリル (7.95g, 150mmol) を添加した。この混合物を室温で一晩攪拌し、そして50mLのジクロロメタンを添加した。この有機層を、ブラインで2回洗浄し、
20 そして乾燥した (MgSO₄)。この溶媒を、ロータリーエバポレーションによって除去した。油状残渣を、200プルーフのエタノールで処理し、そして溶媒をロータリーエバポレーションによって除去した。これを2回繰り返して、過剰な未反応のアクリロニトリルを除去した。生成物をさらなる精製なしに使用した。

【0186】 (ジエチル4, 7, 10-トリオキサトリデカン-1, 13-ジオエート (14)) 2g (9.4mmol) の13を、5mLのエタノールに溶解した。
30 1gの濃硫酸を、5分間にわたって徐々に添加した。この反応系を一晩加熱還流した。この反応物を、40mLの塩化メチレンで抽出し、10mLの水で1回、そして10mLの希ブライン溶液で洗浄した。この有機層を乾燥し (MgSO₄)、そして溶媒を除去して、オイルを得た。この最終生成物を、シリカクロマトグラフィー (塩化メチレン/酢酸エチル) によって精製した。

【0187】 (1, 13-ジヒドロキシ-4, 7, 10-トリオキサトリデカン (15)) テトラヒドロフランを溶媒として使用して、記載のように正確に調製した (1.7g, 5.5mmol) の14, 50mLの希 [CaH₂] THF, 0.66g, 16.5mmol) の水素化アルミニウムリチウム)。一旦添加が完了すると、過剰のLAHをエタノールでクエンチし、そしてこれらの塩を、白色沈殿が形成されるまで飽和硫酸ナトリウム溶液を滴下することによって、沈殿させた。溶媒を除去し、この沈殿物を、30mLのTHFで6回洗浄し、そして合わせた有機抽出物を、エバポレートして、オイルを得た。最終生成物を、シリカクロマトグラフィー (最初に、塩化メチレンで、次いで酢酸エチルで、最後にアセトンで) によって精製した。

【0188】 (1, 13-ジクロロ-4, 7, 10-トリオキサトリデカン (P2を使用するアナログ) (16)) 1.1g (4.9mmol) の15を、30mLの乾燥ベンゼン中の1.15g (14.6mmol) の希ピリジンへ、攪拌しながら添加し、続いて1.8g (14.6mmol) の塩化チオニルを添加した。この混合物を、6時間加熱還流した。氷浴中で冷却した後、5mLの3M HClを、激しく攪拌しながら添加した。有機層を分離し、希ブライン溶液で3回洗浄し、
10 そして乾燥し (NaSO₄)、黄色がかかったオイルを得た。洗浄および溶媒の除去後、このジクロリドをさらなる精製なしで使用した。

【0189】 (追加の工程)

(1, 13-ジシアノ-4, 7, 10-トリオキサドデカン (17)) 4mLのジメチルスルホキシド中の0.78g (15.5mmol) のシアニ化ナトリウムの攪拌溶液へ、80℃で、1g (3.9mmol) の16を添加した。2時間後、この反応物に、10mLの飽和塩化ナトリウム溶液、5mLの水、および50mLの酢酸エチルを添加した。前述のように、この有機層をブライン溶液で3回洗浄し、その後、この有機層を乾燥し (Na₂SO₄)、そして溶媒を除去した。最終生成物を、シリカクロマトグラフィー (塩化メチレン/酢酸エチル) によって精製した。ESI-MS: 予測値、240.1; 実測値、241.1 (M+H)⁺。

【0190】 (1, 15-ジアミノ-5, 8, 11-トリオキサペンタデカン (18)) 0.42g (10.4mmol) の新鮮なLAHを含有する50mLの乾燥THFの攪拌溶液を、アルゴン下で、15分間、穏やかに加熱還流した。15mLの乾燥THF中の0.5g (2mmol) の17を、20分間にわたって滴下し、穏やかな還流を維持した。未反応のLAHを、エタノールでクエンチし、そしてこの混合物を、効率的に攪拌しながら、白色沈殿物が形成するまで、飽和硫酸ナトリウムの滴下で処理した。この混合物を濾過し、そしてこの沈殿物を30mLのTHFで6回洗浄した。有機抽出物を合わせ、そして溶媒をロータリーエバポレーションによって除去し、オイルを得た。ESI-MS: 予測値、248.1; 実測値、249.1 (M+H)⁺。

【0191】 (重水素化) 重水素を、重水素化アルミニウムリチウム (98%D) を使用する14および17の還元によって、このジアミンリンカーに組み込み、
40 d-8重水素化ジアミンを達成した。この合成の他の局面は、この手順について変更されなかった。これらのジオールを、後述のようにSFD結合体の構築において使用した。

【0192】 (サンフィリポ症候群B型 (N- -D-グルコサミニダーゼ欠乏) についての重要な基質合成) (13. p-アミノフェニル -D-N-アセチルグルコサミン (19)) 20mg (0.07mmol) の

p-ニトロフェニル-D-N-アセチルグルコサミン (Sigma) を、5mLの隔壁ラインバイアル (septalined vial) 中、3mLのメタノール中の5mgの洗浄した活性炭担持パラジウム触媒へ、攪拌しながら添加した。この隔壁を、16ゲージ針によって貫通し、そしてこのバイアルのヘッドスペースを、H₂ ガスでフラッシュした。H₂ ガスを、溶液を通してゆっくりと2時間バブルさせ、この後、触媒を、ケイ藻土 (セライト) で濾過することによって除去した。溶媒をロータリーエバポレーションによって除去し、半固体を得た (18mg、90%)。

【0193】 (14. p-アクリルアミドフェニル-D-N-アセチルグルコサミン (20)) 10mg (0.03mmol) の19を、15mLのメタノールおよび100mLのトリエチルアミンへ、攪拌しながら添加した。この溶液を、氷浴中で冷蔵した。15mg (0.17mmol) のアクリロイルクロリドを、2mLの乾燥塩化メチレンに溶解し、そして5分間にわたってこの攪拌溶液に滴下した。この反応系を、室温まで戻し、続いて2時間攪拌した。次いで、溶液を、中性pHが湿性pH紙で得られるまで、連続の陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂 (それぞれ、AG MP-1およびAG MP-50、BioRad) で処理した。溶媒をロータリーエバポレーションで除去し、固体 (11mg、95%) を得た。1H-NMR、収量11mg。

【0194】 (15. 3, 6-ジオキサー-1, 9-ノナンジニトリル (21)) 2g (0.032mmol) のエチレングリコールを、30mLの乾燥ベンゼン中の0.5gの乾燥水酸化カリウムへ、続いて5g (0.096mmol) のアクリロニトリルを添加し、室温で一晩攪拌した。この反応物を濾過し、そして溶媒をロータリーエバポレーションによって除去して、オイルを得た。最終産物を、シリカクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール) によって精製し、無色オイルを得た (3.2g、60%)。

【0195】 (16. 4, 7-ジオキサー-1, 10-デカンジアミン (22)) ラネーニッケル (Aldrich) を、反転およびデカンテーションによって、無水メタノールで5回洗浄した。50mgのこの洗浄した触媒を、20mLの無水メタノールに静置し、続いてテフロン (登録商標) ラインゴム隔壁を取り付けた50mLのスクリュウキャップバイアル中で1g (6mmol) の21に静置した。このバイアルのヘッドスペースを、この隔壁を貫通する16ゲージ針を介して、H₂ でフラッシュした。このキャップを密接にネジで締め、そしてこの全体のアセンブリを、40psi H₂ まで充填し、熱水浴 (80℃) 中に4時間配置し、その後、この固体触媒を、濾過によって除去し、そしてメタノールをエバポレートした。この最終生成物を逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケールカラム、6mL/分、移

動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) によって精製した。

【0196】 (17. 20および22のマイケル付加生成物 (23)) 5mg (0.015mmol) の20を、5mLの0.2M炭酸ナトリウム中の13mg (0.06mmol) の22の攪拌溶液 (pH10.5、37℃) へ添加した。この反応を、3日間進行させ、この後、この溶液を希トリフルオロ酢酸で中和し、そして逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) によって精製した。収量6mg。

【0197】 (18. 4および23のSFB基質結合体 (24)) 4mg (0.013mmol) 量の4を、攪拌しながら、アルゴン雰囲気下で1.5mLの無水DMFに溶解した。10mLの乾燥トリエチルアミン、続いて4mg (0.015mmol) の1を添加した。活性エステルの形成を、シリカTLC (5:1 CHCl₃ / CH₃OH, Rf 0.5, UV) によって、スポットしたTLCプレートを空気流で簡単に乾燥することによってモニターした。25分後、この混合物を、1mLの無水DMF中の6mg (0.012mmol) の23へ添加した。2時間後、溶媒を真空遠心分離によって除去し、そして最終生成物を逆相HPLC (Vydac C-18 分取スケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) によって精製した。収量4.2mg。

【0198】 (19. 1, 9-テトラジューテロー3, 6-ジオキサー-1, 9-ノナンジニトリル (25)) 0.5g (8mmol) のエチレングリコールを、0.1gの乾燥水酸化カリウム (20mLのアセトニトリル中) に添加し、次いで1.4g (24mmol) d-3アクリロニトリルを室温で一晩攪拌しながら添加した。この反応物を濾過し、そして溶媒をロータリーエバポレートにより除去し、オイル状物を得た。最終生成物をシリカクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール) により精製し、無色のオイル状物0.9g (65%) を得た。

【0199】 (20. 1, 9-テトラジューテロー3, 6-ジオキサー-1, 9-ノナンジアミン (26)) Reaneyニッケル (Aldrich) を、インバージョンおよびデカンテーションにより無水メタノールで5回洗浄した。20mgの洗浄した触媒を無水メタノール (30mL) 中に配置し、続いて、0.5g (3mmol) の25 (Teflonラインラバーセプタムを備えた50mLスクリュウキャップバイアル中) を配置した。このバイアルの頭隙を、セプタムを貫通する18-ゲージ針を介してH₂ ガスで排除した。このキャップをしつかりとねじで取り付け、そして全アセンブリを、40psi H₂ でチャージし、そして温水浴 (80℃) に4時

間配置し、その後、この固体触媒を濾過によって取り除き、そしてメタノールをエバポレートした。この最終生成物を、逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分 移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) により精製した。

【0200】(21.23の重水素化したアナログ(27)) 20mg (0.07mmol) のp-アクリルアミドフェニル-D-ガラクトシドを、攪拌した26 (90mg, 0.4mmol) (0.5mLの0.2M炭酸ナトリウム中) の溶液に、pH10.5、37℃で添加した。この反応を3日進行させ、この後、溶液を希釈トリフルオロ酢酸で中和し、逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分、移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) により精製した。収量2mg。

【0201】(22.24の重水素化したアナログ(28)) 2mg (6.3mmol) 量の4を、攪拌しながら無水DMF (1.5mL) 中に、アルゴン雰囲気下で溶解した。5mLのトリエチルアミンを添加し、続いて2.1mg (7.6mmol) の1を添加した。活性エステルの形成は、シリカTLC (5:1CHCl₃ / CH₃OH, Rf0.5, UV) (空気流でスポットしたTLCプレート簡単に乾燥する) によりモニターした。35分後、この混合物を4mg (7mmol) の27 (1mLの無水DMF中) に添加した。2時間後、溶媒を真空遠心分離により除去し、そして最終生成物を、逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分 移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) により精製した。収量1.2mg。

【0202】(23.SFB内部標準結合体(29)) 1.2mgの28を2mLの100mM Tris / 10mM MgCl₂、pH7.3緩衝液に攪拌しながら添加した。15単位の組換え型-D-ガラクトシダーゼ (Sigma) を添加し、そして12時間後に、混合物を逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分 移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) により精製した。収量0.7mg。

【0203】(D型サンフィリボ症候群(スルファターゼ欠乏症)のための臨床的基質の合成) (24.p-アクリルアミドフェニル-D-N-アセチルグルコサミン-6-スルフェート(30)) 100mg (0.28mmol) の20を、10mLの乾燥DMFに、アルゴン雰囲気下で室温で攪拌させながら添加した。89mg (0.56mmol) の硫黄トリオキシドピリジン錯体を、2mLの乾燥DMF中に溶解し、そして0.7×、1.1×、1.3×および1.9×当量(+700mL、+400mL、+200mL、および+6

00mL) で反応物に添加した。反応の進行を、硫酸化剤の各量の添加1時間後に15mLの溶液を除去することにより、5.29ppmから5.24ppmへのアノマー(C1)プロトン化学シフトの¹H-NMRシフトによってモニターした。除去した混合物を真空遠心分離により乾燥し、d-6DMSOに再溶解し、そして分析した。C1アノマープロトンの2形態(出発物質およびC-6スルフェート)以上が出現すると、この反応物を-20℃で取り出し、そして保存した。この生成物を真空遠心分離により溶媒を除去し、逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分 移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) により精製した。収率72%。

【0204】(25.18および30のマイケル付加生成物(31)) 25mg (0.058mmol) の30を、攪拌した83mg (0.35mmol) の18 (5mLの0.2M炭酸ナトリウム中) の溶液に、pH10.5、37℃で添加した。この反応を3日間進行させ、この後、この溶液を希釈トリフルオロ酢酸で中和し、逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分 移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) により精製した。収量10mg。

【0205】(26.4および31のSFD基質結合体(32)) 5.7mg (0.018mmol) 量の4を、1.0mLの無水DMF中にアルゴン雰囲気下で攪拌しながら溶解した。20mLの乾燥トリエチルアミンを添加し、続いて5.5mg (0.020mmol) の1を添加した。活性エステルの形成を、シリカTLC (5:1CHCl₃ / CH₃OH, Rf0.5, UV) (空気流でスポットしたTLCプレート簡単に乾燥する) によりモニターした。25分後、この混合物を10mg (0.015mmol) の31 (1mLの無水DMF中) に添加した。2時間後、溶媒を真空遠心分離により除去し、そして最終生成物を、逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分 移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.08%TFA)) により精製した。収量5.4mg。

【0206】(27.1, 2, 14, 15-オクタジュテロー1, 15-ジアミノ-5, 8, 11-トリオキサペンタデカン(33)) ポリエーテルジアミンリンカーの合成、第2生成において参照される。

【0207】(28.31の重水素化アナログ(34)) 25mg (0.07mmol) の20を、攪拌した100mg (0.4mmol) の11 (5mLの0.2M炭酸ナトリウム中) の溶液に、pH10.5、37℃で添加した。反応を3日間進行させ、この後、この溶液を希釈トリフルオロ酢酸で中和し、逆相HPLC (Vydac C-18分取ースケールカラム、6mL/分 移動相: H₂O (0.08%TFA) / ACN (0.

0.8% TFA)) により精製した。収量7 mg。

【0208】 (29. SFD内部標準結合体 (35)) 4 mg (12.6 μmol) 量の4を、攪拌しながら無水DMF (1 mL) 中に、アルゴン雰囲気下で溶解した。20 mLのトリエチルアミンを添加し、続いて4 mg (14 μmol) の1を添加した。活性エステルの形成は、シリカTLC (5:1 CHCl₃/CH₃OH, Rf 0.5, UV) (空気流でスポットしたTLCプレートを簡単に乾燥する) によりモニターした。20分後、この混合物を7 mg (11 μmol) の34

(1 mLの無水DMF中) に添加した。4時間後、溶媒を真空遠心分離により除去し、そして最終生成物を、逆相HPLC (Vydac C-18分取スケールカラム、6 mL/分 移動相: H₂O (0.08% TFA) /ACN (0.08% TFA)) により精製した。収量2.7 mg。

【0209】 (N-(d-ビオチニル-サルコシニル)-12-アミノドデカン酸 (36)) 化合物4 (32.2 mg, 0.102 mmol) を、減圧下 (P₂O₅ で) で一晚乾燥した。乾燥DMF (2 mL) を添加し、そして混合物を窒素下で溶解に影響を与えるために加温しながら攪拌した。トリエチルアミン (34 mL) を添加し、続いて1 (20.4 mL, 0.115 mmol) を2つの10.2 mL部分にわけて、5分の間隔で添加した。この混合物を、1時間室温で、窒素下で攪拌した。12-アミノドデカン酸 (24.1 mg, 0.112 mmol, Sigma) を、1度に添加し、そしてこの混合物を、2時間室温で、窒素下で攪拌した。CHCl₃ (80 mL) を添加し、そして有機溶液を、1MのHClの2つの10 mL部分で洗浄した。CHCl₃ を、ロータリーエバポレーターにより取り除いた。この化合物をメタノールに溶解し、そして残渣のDMFを真空遠心分離によって除去し、そしてHPLC (Vydac 218 TP, 分取カラム) によって精製した。溶媒プログラムは: 0~10分 (0.06%のTFAを有する水) ; 10~55分 (0.06%のTFAを有する0~100%メタノール) であり、流速が、6 mL/分である。収量31.7 mg。¹H-NMR, ESI-MS、計算値513.4、実測値531.4 (M+H)⁺。

【0210】 (36のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (37)) 化合物36 (9.8 mg, 19 μmol) を窒素下で100 mLの乾燥DMF中に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド (2.2 mg, 19 μmol) を添加し、続いてジクロヘキシルカルボジイミド (3.9 mg, 19 μmol) を添加した。この混合物を、暗闇で60時間室温で攪拌した。溶媒を、真空遠心分離により除去し、そして残渣をCHCl₃/CH₃OH (15/1) ~CHCl₃/CH₃OH (12/1) の勾配を用いるシリカゲルのフラッシュ

クロマトグラフィーに供した。収量9.8 mg。¹H-NMR, ESI-MS、計算値610.8、実測値609.7 (M+H)⁺。

【0211】 (N-(N-(d-ビオチニル-サルコシニル)-12-アミノドデカノイル)-プシコシン (psychosine) (38)) 化合物37 (6.2 mg, 10 μmol) およびプシコシン (psychosine) (4.7 mg, 10 μmol, Sigma) を窒素下で200 mLの乾燥DMF中に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン (5 mL) を添加し、そして、この混合物を、暗闇で2日間窒素下で攪拌した。化合物を直接HPLCカラム (Vydac 218 TPセミー分取) に注入し、そしてこのカラムを2 mL/分で0~20分 (0.06% TFAを有する水)、次いで20~80分 (0.06% TFAを有する0~100%のメタノール) で展開した。収量3.8 mg。¹H-NMR, ESI-MS、計算値957.3、実測値956.8 (M+H)⁺。

【0212】 (N-(N-(d-ビオチニル-サルコシニル)-12-アミノドデカノイル)-スフィンゴシルホスホリルコリン (39)) スフィンゴシルホスホリルコリン (4.0 mg, Sigma) を1 mLの乾燥DMFと共に混合し、そして溶媒を真空遠心分離によって除去した。これをさらに2回繰り返した。最終の乾燥した残渣の重量は、2.5 mg (5.4 μmol) であった。この残渣に、3.3 mgの37 (5.4 mL)、150 mLの乾燥DMF、および2.5 mLのジイソプロピルエチルアミンを添加した。この混合物を、暗闇で3日間窒素下で攪拌した。化合物を直接HPLCカラム (Vydac 218 TPセミー分取) に注入し、そしてこのカラムを2 mL/分で0~20分 (0.06% TFAを有する水)、次いで20~80分 (0.06%を有する0~100%のメタノール) で展開した。収量3.8 mg。¹H-NMR, ESI-MS、計算値960.3、実測値958.7 (M+H)⁺。

【0213】 (1,13-ジアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカンとのd-ビオチンの結合体 (40)) 化合物2を、基本的に3の合成のために記載したように、1,13-ジアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカン (Fluka) と反応させた。この生成物を、1.5 mL/分で30分かけて0.06%のTFAを有する0~100%のメタノールを使用するHPLC (Vydac 218 TP, セミー分取) により精製した。

【0214】 (ヨードアセチル化した40 (41)) 化合物40を、室温で4時間窒素下で攪拌しながら、5当量のヨード無水酢酸 (Aldrich) (乾燥DMF中) で処理した。この生成物を、40についてのようにHPLCで精製した。この構造は、ESI-MSによって同定した。

【0215】（オクタジューテロ化した41（42））この表題化合物を、40についてのように、13-ジアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカンの代わりに9を使用して調製した。

【0216】（オクタジューテロ化した42（43））表題化合物を、41についてのように、42から調製した。この構造をESI-MSによって同定した。

【0217】（例示的MS^N技術および計測）アミノ酸配列によるタンパク質の同定のための自動化LC-MS/MSシステムが、開発されている。略図を図7に示す。オートサンプル、ESI三重極-四重極MS/MS装置にオンライン接続されたキャピラリーHPLCシステムおよびデータシステムからなる、このシステムを以下の方法で操作する：タンパク質（典型的に1Dまたは2Dゲル電気泳動により分離される）を、特定のプロテアーゼ（通常、トリプシン）を用いて切断し、得られた切断フラグメントをオートサンプラーに配置する。37分おきに、オートサンプラーは、1サンプルをHPLCシステムに注入し、そしてペプチドはキャピラリー逆相クロマトグラフィーによって分離される。クロマトグラフィーカラムから分離されたペプチドが溶出すると、これらのペプチドはESIプロセスによりイオン化され、MSに入り、電荷比（ m/z ）に対する質量が測定される。ペプチドの強度が予め測定した強度閾値（intensity threshold）を超える任意のペプチドイオンが、自動的にこの装置によって選択され、不活性ガスを含む衝突セル内で衝突される。これらの衝突により、主にペプチド骨格の結合でのペプチドフラグメント化（衝突誘発される解離（CID））が生じる。このCIDフラグメントの質量が測定され、そしてデータシステムに記録される。ペプチドのCIDスペクトルは、連続MS/MSスペクトルを有する配列データベースを調査することによって、タンパク質を同定する十分な情報を含む。このことは、Sequentプログラムで達成される。このプログラムにより、CIDに対してMSで選択されたペプチドと同じ質量を有する配列データベースで各ペプチドを同定し、同重核の（isobaric）ペプチドの各々に対するMS/MSスペクトルを予想する。実験的に測定されたCIDスペクトルを、コンピュータにより得られる理論的CIDスペクトルと対応させることで、観測したペプチドが由来するタンパク質を同定する。このシステムにより、十分に自動化した様式で、1サンプル当たり40分未満のペースで、タンパク質サンプルを分析することが可能である。各ペプチドは、独立したタンパク質の同定を意味し、そして通常多種のペプチドが1種のタンパク質から導かれるので、この方法によるタンパク質の同定は、余分であり、ゲル中で共遊走する（co-migrating）タンパク質に対して寛容である。このシステムは、ペプチド鎖の修飾された残基の検出および特徴づけのために十分

に適している。LC-MS/MS技術および得られたCIDスペクトルの自動化分析は、本発明の方法のために使用され得る。

【0218】（固相抽出キャピラリー電気泳動タンデム質量スペクトル（SPE-CE-MS/MS）によるサブフェムtomol感度でのタンパク質の同定）この方法によるタンパク質の同定は、ペプチドの分離およびイオン化が著しく高感度で実施されることを除いて、上記と同じ原理に基づく。図8は、キーとなるデザイン要素の略図を示す。このシステムのデザインおよび操作の方法は公表される。タンパク質消化物から誘導されるペプチドは、SPEにより濃縮され、CEにより分離され、そしてESI-MS/MSにより分析される。得られる連続CIDスペクトルを使用して、Sequestソフトウェアシステムで配列データベースを調査した。SPE抽出デバイスは、融合したシリカ分離キャピラリーに直接バックされた寸法0.18×1mmの小さな逆相クロマトグラフィーカラムである。サンプル溶液中に含まれるペプチドは、SPEデバイスにおいて吸着され、濃縮され、見積もられた100～300nlの有機溶媒で溶出され、そして5～30nlの見積り体積まで電気泳動スタッキングおよび/または等速電気泳動によりさらに濃縮される。次いで、これらのペプチドは、CEにより20μmまたは50μmのi.d.キャピラリーにより分離され、ペプチドがキャピラリーを離れるとき直接ESIによりイオン化される（このミクロスプレイイオン化源のデザインについては参考文献13を参照のこと）。このシステムを用いて、ペプチドの質量を、660アットモル（attomole）（20個の残基ペプチドに対して約500fg）の感度で、33amol/μlの濃度限度で測定され得、そしてこのタンパク質は、300amol/μl未満の濃度限度で10fmol（50kDaのタンパク質につき0.5ng）未満の自動的に選択したペプチドのCIDスペクトルにより同定され得る。この技術は、実験により得られるペプチドの非常に高感度の分析のために使用される。自動化CID実験に利用可能な分析時間が、CE電圧のデータ依存性調節により十分に延ばされ得ることも実証されている。いくつかのペプチドイオンが同時にMSで検出される場合、このCE電圧は、自動的にドロップされる。このことで、キャピラリーの電気浸透流が減少し、これによりペプチドイオンをCID用に選択するための利用可能な時間の延長する結果となる。このピークパーキング（peak parking）技術の正味の効果は、技術の動的範囲の延長である。なぜなら、この利用可能な増加した時間が、低イオン電流を有するイオンのCIDに使用されるからである。いったん、全てのペプチドイオンが分析されると、CE電圧が元々の値まで増加することによって、電気泳動が自動的に再加速される。

【0219】表1. α-ラクトアルブミン存在率の相

対的な、余剰の定量（システインが重い同位体のビオチン化剤により修飾された既知量の同じタンパク質との混合後）

【0220】

【表1】

ペプチド#	m/z (軽)	荷電 状態	ペプチド配列	比 (重:軽)
1	518.4	2+	(K) IWCK	2.70
2	568.4	2+	(K) ALCSEK	2.68
3	570.4	2+	(K) CEVFR	2.90
4	760.5	2+	(K) LDQWLCEK	2.82
5	710.1	3+	(K) FLDDDLTDDIMCVK	2.88
6	954.2	3+	(K) DDQNPSSNICNISCDK	2.90
7	1288.9	4+	(K) GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDT QAIVQNNDSTEYGLFQINNK	NA*

a 4-ペプチドでは、重イオンと軽イオンとの2amuのみの差に起因して、同位体パターンが高度にオーバーラップしたため、同位体比を分析しなかった。

化合物の成分の、配列同定および定量

【0222】

【表2】

【0221】表2. 単一の分析におけるタンパク質混

遺伝子名	同定したペプチド配列	既知した 比 (d0/d8)*	平均± 標準偏差	予測した比 (d0/d8)*	% 誤差
LCA_BOVIN	ALC#SEK C#EVFR FLDDDLTDDIMCVK	0.94 1.03 0.92	0.96±0.06	1.00	4.2
OVAL_CHICK	ADHPFLFC#K YPILPEYLQC#VK	1.88 1.96	1.92±0.06	2.00	4.0
BGAL_ECOLI	LTAAC#FDR IGLNC#QLAQVAER IIFDGVNSAFHLWC#NGR	1.00 0.91 1.04	0.98±0.07	1.00	2.0
LACB_BOVIN	WENGEC#AQK LSFNPTQLEEQC#HI	3.64 3.45	3.55±0.13	4.00	11.3
G3P_RABIT	VPTPNVSVVDLTC#R IVSNASC#TTNC#LAPLAK	0.54 0.57	0.56±0.02	0.50	12.0
PHS2_RABIT	IC#GGWQMEEADDWLR TC#AYTNHTVLPEALER WLVLC#NPGLAEIIAER	0.32 0.35 0.30	0.32±0.03	0.33	3.1

* 遺伝子名は、Swiss Prot命名法に従う
(www.expasy.ch)。

† 各ペプチドについて、図3に示すように、比を計算した。

= 予測した比を、各混合物に存在する既知量のタンパク質から計算した。

ICA T標識化システニル残基。

【0223】表3. 炭素源としてガラクトースまたはエタノール上で増殖するイーストからの、タンパク質プロフィール。

【0224】

【表3】

61

62

遺伝子名*	同定したペプチド配列†	検出レベル‡ (Eth:Gal)	ガラクトース により抑制	グルコース により抑制
ACH1	KHNC#LHEPHMLK	>100:1	✓	
ADH1	YSGVC#HTDLHAWHGDWPLPVK C#C#SDVFNQVVK	0.57:1 0.48:1		
ADH2	YSGVC#HTDLHAWHGDWPLPTK C#SSDVFNHVVK	>200:1 >200:1	✓	✓
ALD4	TFEVNPSTEEIC#HIYEGR	>100:1	✓	✓
BMH1	SEHQVELIC#SYR	0.95:1		
CDC19	YRPNC#PIILVTR NC#TPKPTSTTETVAASAAVFEOK AC#DDK	0.49:1 0.65:1 0.67:1		
FBA1	SIAPAYGIPVVLHSDHC#AK EQVGC#K	0.60:1 0.63:1		
GAL1	LTGAGWGGC#TVHLVPGGPNGNIEK	1:>200		✓
GAL10	HHPFYVDLC#DR DC#VTLK	1:>200 1:>200		✓
GCY1	LWC#TQHHPEVALDQSLK	0.34:1		✓
GLK1	IC#SVNLHGDHTFSMEQMK	0.65:1		
GPD1	IC#SQLK	0.54:1		✓
ICL1	GGTQC#SIMR	>100:1		✓
IPP1	NC#FPHHGYIHNYGAFPQTWEDPNVS- HPETK	0.76:1		
LPD1	VC#HAHPTLSEAFK	1.30:1		✓
PEP4	KGWTGQYTLDC#NTR	2.60:1		✓
PSA1	SVVLC#NSTIK	0.56:1		
PGM2	C#TGGIILTASHNPGGPENDMGIK LSIC#GEESFGTGSNHVR	0.58:1 0.62:1		✓
PCK1	C#PLK IPC#LADSHPK C#INLSAEKEPEIFDAIK C#AYPIDYIPSAK IVEEPTSKDEIWWGPVNKPC#SER	1.59:1 1.47:1 1.52:1 1.41:1 1.85:1		✓
OCR5	ALVHHYEEC#AER	1.30:1		✓
RPL1A [§]	SC#GVDAMSVDDLKK	0.82:1		
SAH1	HPEMLEDC#FGLSEETTTGVHHLR EC#INIKQVDR	0.62:1 0.74:1		
SOD1	GFHHEFGDATNGC#VSAGPHFNPFK	0.46:1		✓
TEF1	RGNVC#GDAK C#GGIDK FVPSKPMC#VEAFSEYPPLGR	0.81:1 0.70:1 0.74:1		
VMA2	IPFSASGLPHNEIAAQIC#R	0.70:1		
YHB1	HYSLC#SASTK	0.69:1		

* 遺伝子名は、Yeast Proteome Database (YPD) に従う (19)。

システイニル残基は ICA T 標識化される。

† タンパク質発現比を、図 3 に記載のように計算した。

= イースト増殖のための炭素源は、2%エタノール (Eth) または 2%ガラクトース (Gal) であっ

た。

§ 遺伝子は、ガラクトースまたはグルコースにより抑制されることが公知である (19)。

¶ 他の 8 つのリボソームタンパク質を、類似の遺伝子発現レベルで検出した。

[0225]

【表 4】

表4

疾患	酵素	機能不全
ブチリルコリン エステラーゼ欠損症	BCHE	酵素活性の減少または 非存在
本態性果糖肝フルクト キナーゼ欠損症	フルクトキナーゼ	酵素活性の欠損
遺伝的果糖不耐症	フルクトース1,6-ビス リン酸アルドラーゼB	酵素活性の欠損
遺伝的フルクトース1,6- ジホスファターゼ欠損症	フルクトース1,6- ビスホスファターゼ	酵素活性の欠損
非球状赤血球性溶血性貧血 を伴う赤血球アルドラーゼ 欠損症 (アルドラーゼA 欠損症)	フルクトース1,6-ビス リン酸アルドラーゼA	酵素活性の欠損
糖原病1a型 (フォン・ギエルケ病)	グルコース6- ホスファターゼ	酵素活性の非存在 または欠損
糖原病1b型	グルコース6-リン酸 トランスロカーゼ	小胞体の膜を横切る グルコース6-リン酸の 移送の欠損
糖原病111型	アミロ-1,6-グルコシダーゼ (脱分枝酵素)	酵素活性の非存在 または欠損
糖原病1V型 (アンダーソン病)	α -1,4-グルカン-6- α -グル コシルトランスフェラーゼ	酵素活性の欠損
糖原病V型 (マックアードル病)	筋肉グリコゲン ホスホリラーゼ	酵素の非存在または 欠損
糖原病X連鎖性ホスホリ ラーゼキナーゼ欠損症	ホスホリラーゼ α - キナーゼ	酵素活性機能の欠損 または非存在
糖原病常染色体ホスホリ ラーゼキナーゼ欠損症	ホスホリラーゼ α - キナーゼ	酵素活性の欠損
糖原病肝ホスホリラーゼ 欠損症	肝ホスホリラーゼ	酵素活性の欠損
糖原病VII型 (巻井病)	筋肉ホスホ フルクトキナーゼ1	酵素活性の欠損
肝グリコゲンシンターゼ 欠損症	肝グリコゲン シンターゼ	未知

(表4の続き)

疾患	酵素	機能不全
ホスホグリセレート キナーゼ欠損症	ホスホグリセレート キナーゼ	酵素の欠損
ホスホグリセレート ムターゼ欠損症	ホスホグリセレート ムターゼ	酵素の欠損
筋肉乳酸デヒドロゲナーゼ 欠損症	乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)の筋肉特異的な サブユニット	LDHのHサブユニットの 非存在。筋肉LDHは、心 臓特異的なサブユニット の四量体である。
グルコースリン酸 イソメラーゼ欠損症	グルコースリン酸 イソメラーゼ	未知
トランスフェラーゼ欠損性 ガラクトース血症	ガラクトース-1-リン酸ウリ ジルトランスフェラーゼ	酵素活性の欠損
ガラクトキナーゼ欠損性 ガラクトース血症	ガラクトキナーゼ	酵素活性の欠損
エピメラーゼ欠損性 ガラクトース血症	ウリジン二リン酸ガラクト ース-4-エピメラーゼ	血球のみにおける(良 性)、またはより稀に、 全組織における(全身 性)酵素活性の欠損
PAH欠損に起因する フェニルケトン尿症(PKU)	フェニルアラニン ヒドロキシラーゼ(PAH)	PAH活性の欠損または 非存在(正常の1%未 満)
DHPR欠損に起因する 高フェニルアラニン血症	ジヒドロプテリジン レダクターゼ(DHPR)	DHPR活性の欠損または 非存在
GTP-CH欠損に起因する 高フェニルアラニン血症	グアノシン三リン酸 シクロヒドロラーゼ (cyclohydrolase)(GTP-CH)	酵素活性の欠損
5-PTS欠損に起因する 高フェニルアラニン血症	5-ビルボイルテトラヒドロ プテリンシンターゼ(5-PTS)	酵素活性の欠損
眼皮膚チロシン血症 (チロシン血症II型; チロシンアミノトランス フェラーゼ欠損症)	チロシンアミノ トランスフェラーゼ	活性の欠損
4-ヒドロキシフェニルビル ビン酸ジオキシゲナーゼ (チロシン血症III型)	4-ヒドロキシフェニルビル ビン酸ジオキシゲナーゼ	活性の欠損
マレイルアセトアセテート イソメラーゼ欠損症(チロ シン血症Ib型)(暫定)	マレイルアセトアセテート (maleylacetonacetal) イソメラーゼ	恐らく酵素活性の減少

(表4の続き)

疾患	酵素	機能不全
肝腎チロシン血症 (チロシン血症Ⅰ型: フマリルアセト酢酸 ヒドロラーゼ欠損症)	フマリルアセト酢酸 ヒドロキシラーゼ	酵素活性の欠損
カルバミルリン酸 シンターゼ欠損症	カルバミルリン酸 シンターゼⅠ	酵素活性の非存在 または欠損
オルニチントランス カルバミラーゼ欠損症	オルニチントランス カルバミラーゼ	酵素活性の非存在 または減少
アルギニコハク酸 シンターゼ欠損症	アルギニコハク酸 シンターゼ	酵素活性の欠損
アルギニノスクシナーゼ 欠損症	アルギニノコハク酸 リアーゼ	酵素活性の欠損
アルギナーゼ欠損症	肝アルギナーゼ	酵素活性の欠損
家族性高リシン血症(変異 体: サッカロビン尿症)	α -アミノアジピン セミアルデヒドシンターゼ	酵素活性の欠損
カエデシロップ尿病(MSUD) または分枝鎖ケト酸血症	分枝鎖 α -ケト酸 デヒドロゲナーゼ	ミトコンドリアにおける BCKAD複合体活性の欠損 または非存在(2%未 満); 酵素サブユニット の免疫学的な非存在また は減少レベル; E1サブ ユニットアセンブリの欠 陥
シスタチオニン β - シンターゼ欠損症	シスタチオニン β - シンターゼ	酵素活性の欠損
α -シスタチオナーゼ 欠損症	α -シスタチオナーゼ	酵素活性の欠損
肝メチオニアデノシル トランスフェラーゼ欠損症	メチオニアデノシル トランスフェラーゼの アイソエンザイム	酵素活性の欠損
サルコシン血症	サルコシン デヒドロゲナーゼ?	酵素活性の欠損
非ケトン性高グリシン血症	グリシン切断系	酵素活性の欠損
高ウラシルチミン尿症	ジヒドロピリミジン デヒドロゲナーゼ	酵素活性の欠損
ジヒドロピリミジン尿症 (dihydropyrimidinuria)	ジヒドロピリミジナーゼ	未知
発作を伴うビリドキシ ン依存症	脳ガラタミン酸 デカルボキシラーゼ-1	補酵素結合の欠乏? (脳)

(表4の続き)

疾患	酵素	機能不全
GABAアミノトランスフェラーゼ欠損症	GABA- α -ケトグルタレートトランスアミナーゼ	酵素活性の欠損
4-ヒドロキシ酪酸尿症	コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	酵素活性の欠損
血清カルノシナーゼ欠損症およびホモカルノシン症	血清カルノシナーゼ	酵素の欠損
アルカプトン尿症	ホモゲンチン酸オキシダーゼ	酵素活性の非存在または欠損
イソ吉草酸血症	イソバレリルCoAデヒドロゲナーゼ	酵素活性の欠損、タンパク質の欠損、異常なペプチドサイズ
孤立性3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症	3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ	酵素活性の欠損
3-メチルグルタコン酸尿症 弱い形態:	3-メチルグルタコンニルCoAヒドラターゼ	酵素活性の欠損
3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoAリアーゼ欠損症	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoAリアーゼ	酵素活性の欠損
メバロン酸尿症	メバロン酸キナーゼ	酵素活性の欠損
ミトコンドリアアセトアセチルCoAチオラーゼ欠損症	ミトコンドリアアセトアセチルCoAチオラーゼ(T2)	酵素活性の欠損、タンパク質の減少、不安定なタンパク質
プロピオン酸血症 (<i>prca</i> および <i>prcBC</i> と表記される2つの非対立遺伝子形態)	プロピオニルCoAカルボキシラーゼ(PCC)	酵素活性の欠損(非対立遺伝子形態が、PCCの同一でないサブユニットでの変異を反映する)
メチルマロン酸血症(<i>mut</i> [*] および <i>mut</i> と表記される2つの非対立遺伝子改変体)	メチルマロニル(Methidmalonyl)CoAムターゼ(MUT) アボ酵素	<i>mut</i> [*] においてはMUT活性の非存在、 <i>mut</i> においては補因子(アデノシルコバラミン)に対する親和性の減少に起因するMUT活性の欠損
グルタル酸血症I型	グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ	酵素活性の欠損
シトクロムオキシダーゼ欠損症	シトクロムオキシダーゼポリペプチド	シトクロムオキシダーゼ複合体の活性の減少

(表 4 の続き)

疾患	酵素	機能不全
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損症-E, デカルボキシラーゼ成分	ビルビン酸 デカルボキシラーゼ、 E, α	酵素活性の減少、 タンパク質の減少
ビルビン酸デヒドロゲナーゼE, トランスアシラーゼ	ジヒドロリボアミド トランスアシラーゼ	酵素活性の減少； タンパク質の異常な 電気泳動移動能
複合 α -ケト酸デヒドロゲナーゼ欠損症/リボアミド デヒドロゲナーゼ欠損症	リボアミド デヒドロゲナーゼ	酵素活性の欠損
ビルビン酸 カルボキシラーゼ欠損症	ビルビン酸 カルボキシラーゼ	酵素活性の非存在； 7つの場合の酵素、 タンパク質、および mRNAの非存在
カルニチンパルミトイル トランスフェラーゼI (CPT I)欠損症	カルニチンパルミトイル トランスフェラーゼI	酵素の欠損
カルニチン/アシルカルニ チントランスロカーゼ 欠損症	カルニチン/アシルカルニ チントランスロカーゼ	トランスロカーゼの欠損
カルニチンパルミトイル トランスフェラーゼII (CPT II)欠損症	カルニチンパルミトイル トランスフェラーゼII	酵素の欠損
非常に長鎖のアシルCoAデヒ ドロゲナーゼ(VLCAD)欠損症	非常に長鎖のアシルCoA デヒドロゲナーゼ	酵素の欠損
長鎖アシルCoA デヒドロゲナーゼ(LCAD)	長鎖アシルCoA デヒドロゲナーゼ	酵素の欠損
長鎖L-3-ヒドロキシアシル CoAデヒドロゲナーゼ (LCHAD)欠損症	L-3-ヒドロキシアシルCoA デヒドロゲナーゼ	酵素の欠損
三官能性(trifunctional) 酵素(TFE)欠損症	三官能性酵素	酵素の欠損
ジエノイルCoA(dienoyl-CoA) レダクターゼ欠損症	2,4-ジエノイルCoA レダクターゼ	酵素の欠損
中鎖アシルCoAデヒドロゲナ ーゼ(MCAD)欠損症	中鎖アシルCoA デヒドロゲナーゼ	酵素の欠損
短鎖アシルCoAデヒドロゲナ ーゼ(SCAD)欠損症	短鎖アシルCoA デヒドロゲナーゼ	酵素の欠損

(表4の続き)

疾患	酵素	機能不全
グルタル酸血症II型	電子移動黄色タンパク (ETF); ETF: ユビキノン オキシレダクターゼ	ある場合には、酵素抗体がない; 他の場合には、酵素活性がない
グリセロールキナーゼ欠損症 (Gkd)	グリセロールキナーゼ	ミクロ欠失 (microdeletion) には、GKのみでなく他の欠失位置 (すなわち、AHC、DND、DCT、および他の連結位置) も関与する
原発性痛風: ホスホリボシルピロリン酸 (PP-リボース-P) シンターゼの過度活性改変体	PP-リボース-Pシンターゼ	酵素活性の増大
原発性痛風: ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRF) の部分的欠損症	ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRF)	酵素活性の非存在または欠損
レッシュ-ナイハン症候群: ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRF) の欠損症	ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRF)	酵素活性の非存在または欠損
2,8-ジヒドロキシアデニン結石症 (アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損症)	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ	I型: 非存在の酵素活性; II型: PP-リボース-Pに対する親和性の減少
重症複合免疫不全疾患を伴うアデノシンデアミナーゼ欠損症	アデノシンデアミナーゼ	酵素活性の非存在または大きな減少
細胞性免疫不全を伴うプリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損症	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	酵素活性の非存在または大きな減少
ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症	ミオアデニル酸デアミナーゼ (AMPD1)	酵素活性なし; 免疫活性タンパク質上
キサンチン尿症	キサンチンデヒドロゲナーゼ (キサンチンオキシダーゼ)	I型: キサンチンデヒドロゲナーゼ活性の非存在; II型: キサンチンデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドオキシダーゼ活性の非存在

表4の続き

疾患	酵素	機能障害
遺伝性オロチン酸尿症	UMPシンターゼ	不完全な酵素活性（不安定なタンパク質）
ピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ欠損症	ピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ	非存在のまたは不安定な酵素
ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症	ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ	非存在のまたは不安定な酵素
ジヒドロピリミダーゼ欠損症	ジヒドロピリミダーゼ	非存在のまたは不安定な酵素
家族性リボタンパク質リパーゼ欠損症	リボタンパク質リパーゼ	あるものにおいては非機能性タンパク質、他のものにおいては検出不能な酵素活性およびタンパク質
家族性レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠損症	レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ	非存在の酵素タンパク質または不完全な酵素活性
δ-アミノレブリン酸デヒドラターゼ	δ-アミノレブリン酸デヒドラターゼ	最小酵素活性
急性間欠性 ポルフィリン症	ポルホビリノーゲンデアミナーゼ	減少した酵素活性（約50%）
先天性造血性 ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲンIII コシンターゼ	最小酵素活性
晩発性皮膚ポルフィリン 症（家族性形態）	ウロポルフィリノーゲン デカルボキシラーゼ	減少した酵素活性（約50%）
肝造血性ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン デカルボキシラーゼ	最小酵素活性
遺伝性 コプロポルフィリン症	コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ	減少した酵素活性（約50%）
変異型ポルフィリン症	プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ	減少した酵素活性（約50%）
赤芽球増殖性 プロトポルフィリン症 (protoporphyrria)	フェロケラターゼ	減少した酵素活性（約50%）
クリグラール-ナジャー 症候群、I型	ビリルビンUDP- グルクロノシルトランスフェラーゼ	非存在の酵素活性
クリグラール-ナジャー 症候群、II型	ビリルビンUDP- グルクロノシルトランスフェラーゼ	顕著に減少した酵素活性

表4の続き

疾患	酵素	機能障害
ジルベール症候群	ビリルビンUDP- グルクロノシルトランスフェラーゼ活性	減少した酵素活性
レフサム病	フィタン酸 α -ヒドロキシラーゼ	不完全な酵素活性
原発性高シュウ酸尿症 1型	アラニン-グリオキシレート アミノトランスフェラーゼ	酵素触媒活性の損失および 異常な非細胞分布
原発性高シュウ酸尿症 2型	グリオキシレートレダクターゼ/ D-グリセレートデヒドロゲナーゼ	酵素触媒活性の損失
G _{M2} ガングリオシドーシス: ヘキササミニダーゼ (hexosaminidase) α -サブユニ ット欠損症 (改変体B、 テイスザックス病)	β -ヘキササミニダーゼ	非存在のまたは不完全なヘキ ソサミニダーゼA ($\alpha\beta$) 活性
糖原病II型	α -グルコシダーゼ	非存在のまたは不完全な 酵素活性
Δ コ多糖体症I型 (フル ラー症候群、シャイエ症 候群、およびハーラー シャイエ症候群、MP S、MPS IS、MP S IH/S)	α -リーイズロニダーゼ	非存在の酵素活性
Δ コ多糖体症II型 (ハ ンター症候群)	イズロン酸スルファターゼ	非存在の酵素活性
Δ コ多糖体症III型 (サンフィリボ症候群) A型、B型、C型 およびD型	IIIA: ヘパランN-スルファターゼ IIB: α -N-アセチル グルコサミニダーゼ IIC: アセチル-CoA: α -グル コサミニドアセチルトランスフェラーゼ IID: N-アセチルグルコサミン- 6-スルファターゼ	非存在の酵素活性
Δ コ多糖体症IV型 (モルキオ症候群) A型およびB型	IVA: ガラクトース6- スルファターゼ IVB: B-ガラクトシダーゼ	非存在の酵素活性
Δ コ多糖体症V型 (マ ロト-ラミー症候群)	N-アセチル-ガラクトサミン4- スルファターゼ	非存在の酵素活性
Δ コ多糖体症VI型 (スライ症候群)	β -グルクロニダーゼ	非存在の酵素活性

表4の続き

疾患	酵素	機能障害
I細胞疾患 (ML-11)	N-アセチルグルコサミニル-1- ホスホトランスフェラーゼ	多くのリソソーム酵素の リン酸化
シンドラー病 (α -N- アセチル-ガラクトサミ ニダーゼ欠損症)	α -N-アセチル- ガラクトサミニダーゼ	α -N-アセチル-ガラクト サミニダーゼの不完全な活性
α -マンノシドーシス	α -D-マンノシダーゼ	不完全または不安定な 酵素活性
β -マンノシドーシス	β -D-マンノシダーゼ	不完全な酵素活性
シアリドーシス	α -ノイラミニダーゼ	不完全な酵素活性
アスパルチル グルコサミン尿症	アスパルチルグルコサミニダーゼ	不完全な酵素活性
フコシドーシス	α -L-フコシダーゼ	不完全な酵素活性
ウォルマン病およびコレ ステリルエステル蓄積病	酸性リパーゼ	不完全な酵素活性
セラミダーゼ欠損症 (Farber脂肪 肉芽腫症)	セラミダーゼ	不完全な酵素活性
ニーマン-ピック病 (N PD) A型およびB型 (尿毒性スフィンゴミエ リン蓄積)	スフィンゴミエリナーゼ	不完全なスフィンゴ ミエリナーゼ活性
ゴシェ病I型 (神経細胞 浸食性)	グルコセレブロシダーゼ	減少した触媒活性および いくつかの不安定酵素 タンパク質
球状細胞白質萎縮症 (ク ラッペ病)	ガラクトシルセラミダーゼ	非存在の酵素活性
異染色性白質萎縮症	アリールスルファターゼA	不完全な酵素活性
ファブリー病	α -ガラクトシダーゼA	非機能性または不安定な 酵素タンパク質
G _{M1} ガングリオシドー シス	酸性 β -ガラクトシダーゼ (GLB1)	不完全な酵素活性
G _{M1} ガングリオシドーシ ス:ヘキササミニダーゼ α -サブユニット欠損症 (改変体B、ティーサッ クス病)	β -ヘキササミニダーゼ	非存在のまたは不完全なヘキ ソサミニダーゼA (α β) 活性
ステロイド21-ヒドロ キシラーゼ欠損症 塩類喪失型	ステロイド21-ヒドロキシラーゼ	活性を有さない、非存在の または短縮型酵素

表4の続き

疾患	酵素	機能障害
ステロイド5 α -レダクターゼ2欠損症	ステロイド5 α -レダクターゼ2	非存在のまたは不安定な酵素活性
ステロイドスルファターゼ欠損症 (X染色体性魚鱗病)	3 β -ヒドロキシステロイドスルファターゼ	非存在の免疫反応性および酵素的に活性なタンパク質 (欠失および非欠失型の両方)
メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ欠損症	メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ	非存在のまたは不完全な酵素活性。易熱性変異体は記載されている。
ホロカルボキシラーゼシンテターゼ欠損症	ホロカルボキシラーゼシンテターゼ	不完全なホロカルボキシラーゼシンテターゼ活性
ピオチニダーゼ欠損症	ピオチニダーゼ	不完全なピオチニダーゼ活性
シトクロムb ₅ レダクターゼ欠損症 I型、II型およびIII型に対して2次的な先天性メトヘモグロビン血症	シトクロムb ₅ レダクターゼ	赤血球細胞質ソルのみにおいて (I型)、全組織において (II型)、および全造血細胞 (III型) において不完全な酵素活性
ビルビン酸キナーゼ欠損性溶血性貧血	ビルビン酸キナーゼ	不完全な酵素活性
ヘキソキナーゼ欠損性溶血性貧血	ヘキソキナーゼ	不完全な酵素活性
グルコースリン酸イソメラーゼ欠損性溶血性貧血	グルコースリン酸イソメラーゼ	不完全な酵素活性
アルドラーゼ欠損性溶血性貧血	アルドラーゼ (A型)	不完全な酵素活性
トリオースホスフェートイソメラーゼ欠損性溶血性貧血	トリオースホスフェートイソメラーゼ	全ての組織において不完全な酵素活性
ホスホグリセレートキナーゼ欠損性溶血性貧血	ホスホグリセレートキナーゼ	ヘミ複合体において不完全な酵素活性
2, 3-ジホスホグリセロムターゼおよびホスファターゼ欠損症	2, 3-ジホスホグリセロムターゼおよびホスファターゼ (1タンパク質)	不完全な酵素活性
6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ欠損症	6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ	酵素活性欠損

表4の続き

疾患	酵素	機能障害
グルタチオンペルオキシダーゼ欠損症	グルタチオンペルオキシダーゼ	減少した酵素活性
グルタチオンレダクターゼ欠損症	グルタチオンレダクターゼ	不完全な酵素活性
グルタチオンシンテターゼ欠損性溶血性貧血	グルタチオンシンテターゼ	不完全な酵素活性
γ -グルタミルシステインシンテターゼ欠損性溶血性貧血	γ -グルタミルシステインシンテターゼ	不完全な酵素活性
アデノシンデアミナーゼ機能亢進性溶血性貧血	アデノシンデアミナーゼ	mRNA翻訳レベルで媒介された構造的に正常な酵素タンパク質の過剰産生
ピリミジンヌクレオチダーゼ欠損性溶血性貧血	ピリミジンヌクレオチダーゼ	不完全な酵素活性
ミエロペルオキシダーゼ欠損症	ミエロペルオキシダーゼ	非存在のまたは不完全な酵素活性
カルボニックアンヒドラーゼII欠損症候群 (尿細管性アシドーシスを伴う大理石骨病)	カルボニックアンヒドラーゼII	カルボニックアンヒドラーゼIIの量的欠損
白皮症、眼皮膚チロシナーゼ-陰性型 (OCA1A)	チロシナーゼ	非存在の、減少した、または異常な酵素活性
キャナヴァン病	アスパルトアミラーゼ	不完全な酵素活性

表5. プロトン化およびナトリウム化 (sodiated) 基質結合体、生成物、およびCDGS酵素に対する内部標準の、分子量

【0226】

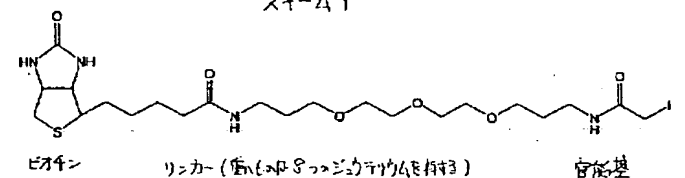
【表5】

酵素	基質		生成物		内部標準	
	(M + H) ⁺	(M + Na) ⁺	(M + H) ⁺	(M + Na) ⁺	(M + H) ⁺	(M + Na) ⁺
Type Ia,b	711	733	549	571	555	577
Manose-transferase	725	747	563	585	570	592
Type II	1156	1178	1343	1365	1348	1370
Type	1126	1148	2362 ^a	2384 ^a	2367 ^a	2389 ^a

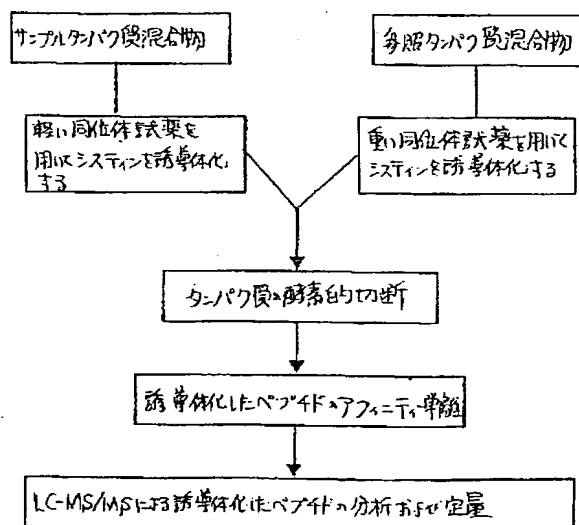
10

^a GlcNAc-GlcNAc-マンノース-(マンノース-GlcNAc)₂ 残基を含むC1cNAc-T 【0227】
【化5】
II 生成物および内部標準について算出した。

スキーム1



質量分析による安定な同位体比に基づく定量的タンパク質プロファイル検定の
ための新規なフローチャート図

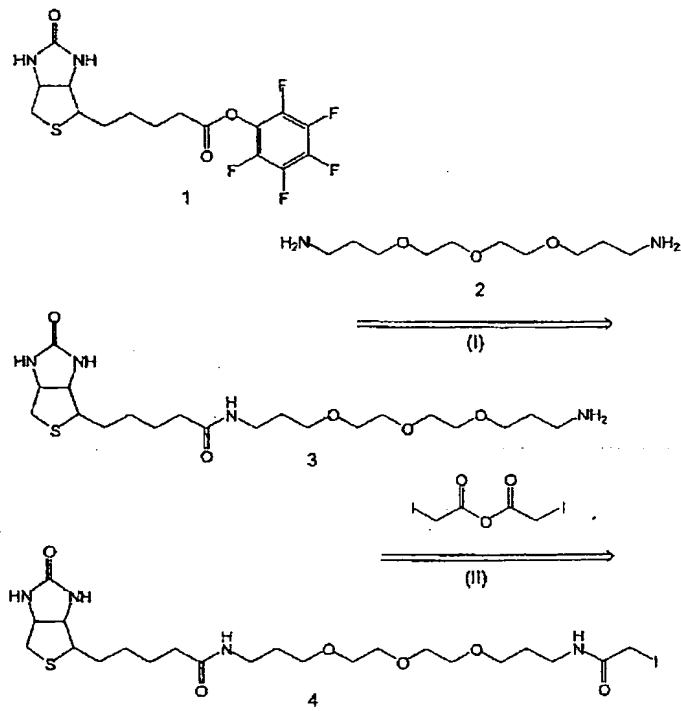


【0228】

【化6】

スキーム 2

シアニドリル反応性ビオチン化試薬の慣習的有機合成（シカ-13）
同位体の重く（48）及び（40）が示したとおり。

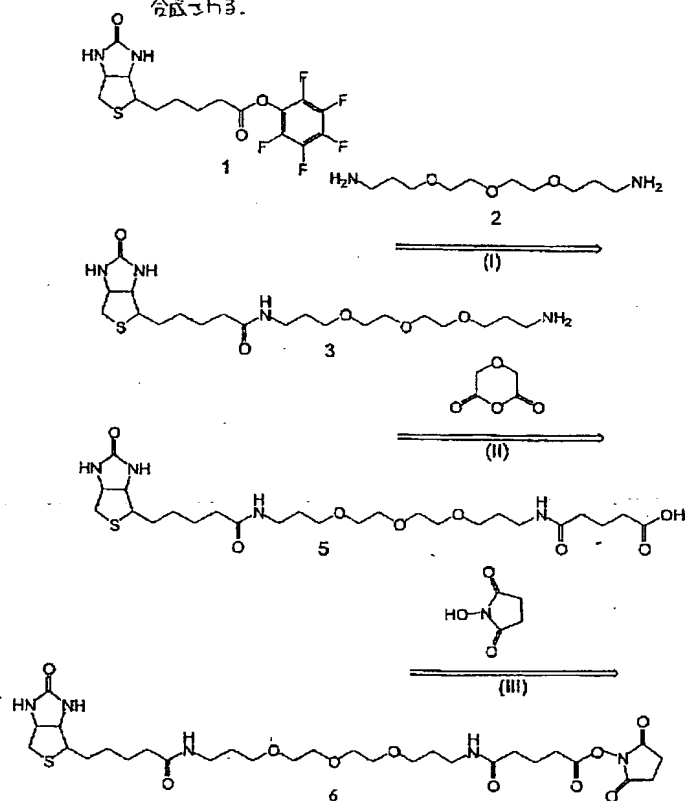


【0229】

【化7】

スキーム3

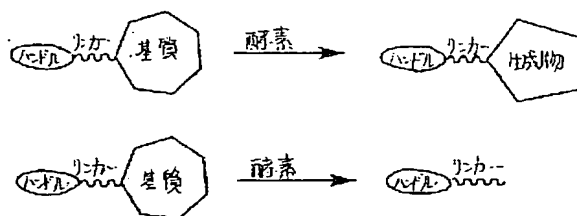
遊離アミノ基のヒオニ化に特異的試薬の合成。この試薬は、同位体的に重い形態(4f)または軽い形態(4c)のいずれかでも合成される。



【0230】

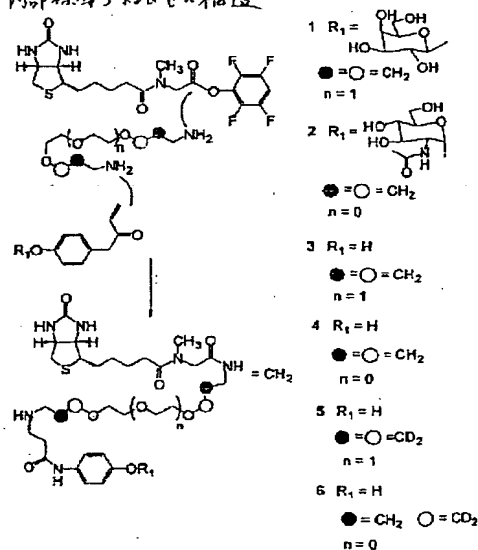
【化8】

スキーム 4



スキーム 5

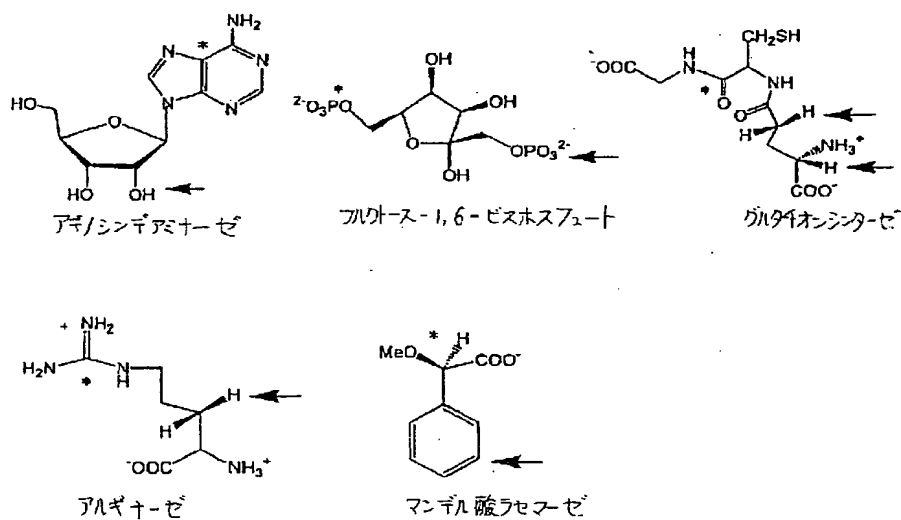
基質結合体1及び2、生成物結合体3及び4、な5及び6の構造



【0231】

【化9】

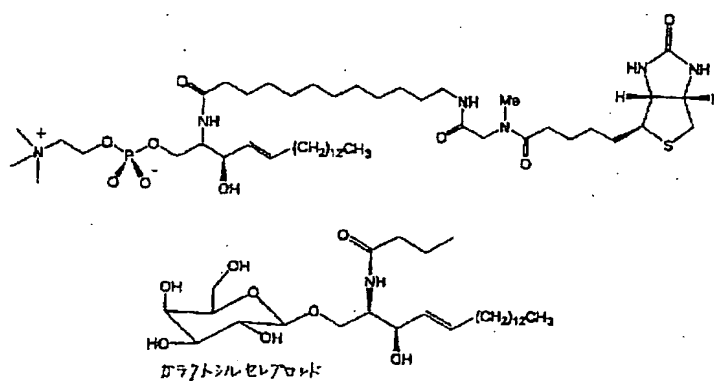
スキーム 6



【0232】

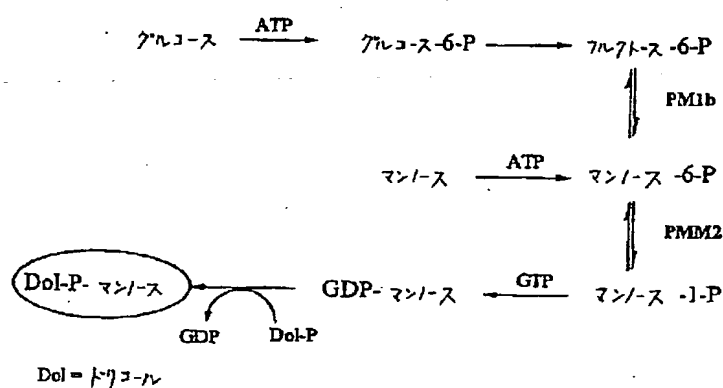
【化10】

スケム 7



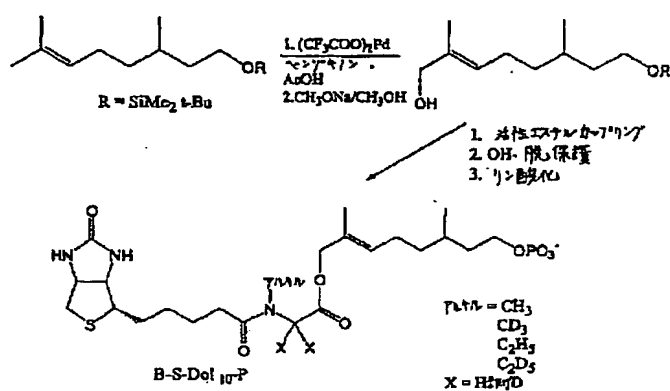
【0233】

スケム 8 【化11】



【0234】

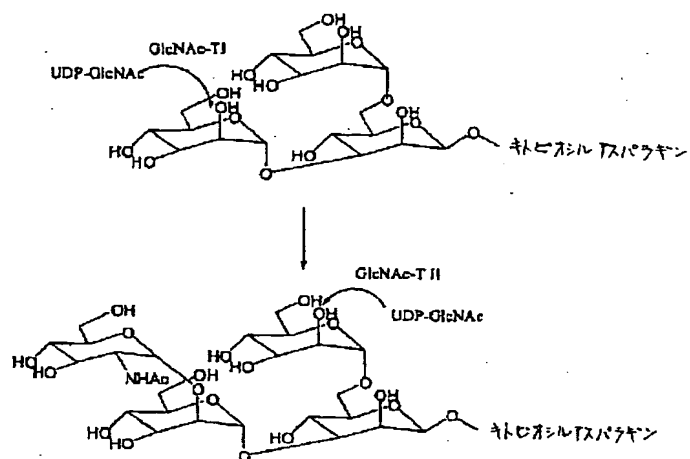
スケム 9 【化12】



【0235】

【化13】

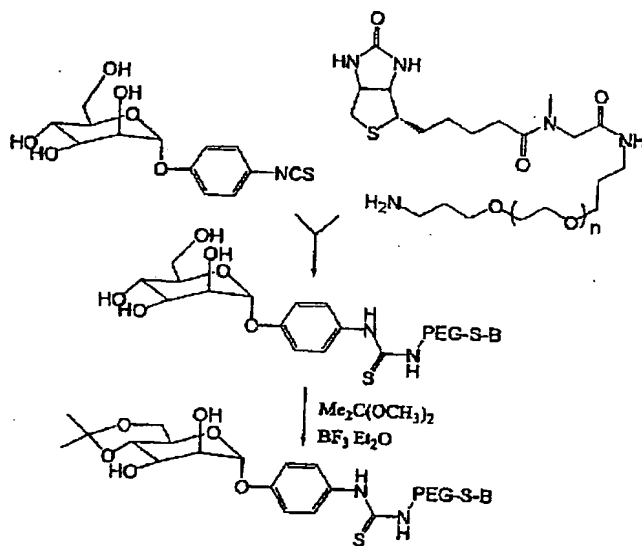
ス1-ム 10



【0236】

【化14】

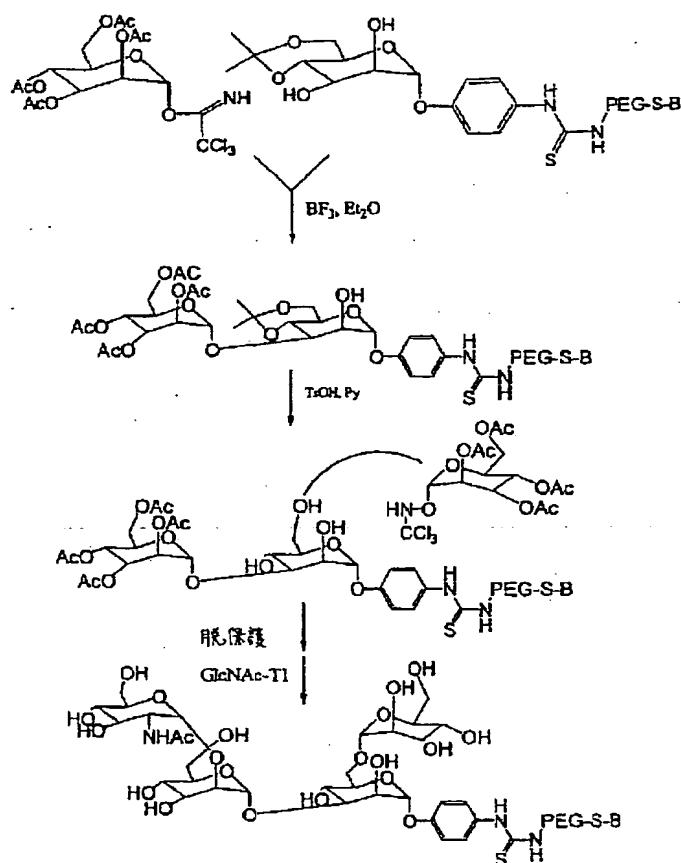
ス1-ム 11



【0237】

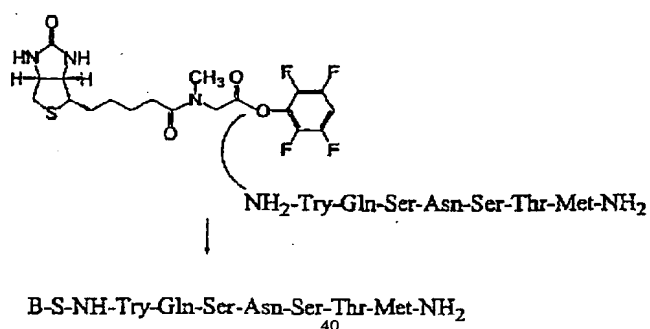
【化15】

入特-4 12



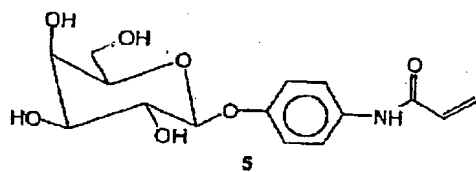
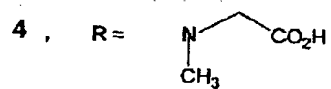
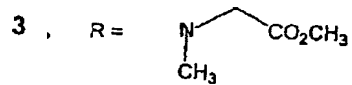
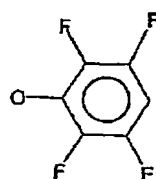
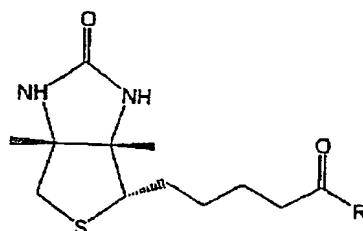
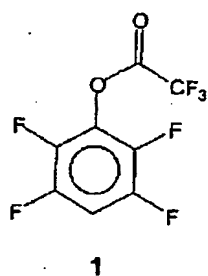
【0238】

入特-4 13 【化16】



【0239】

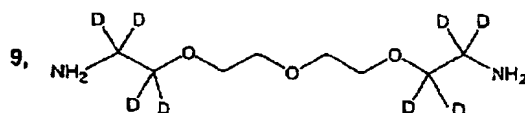
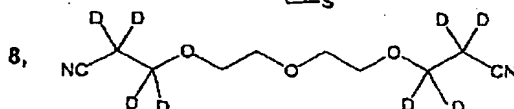
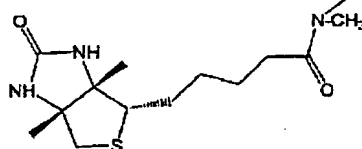
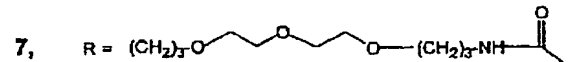
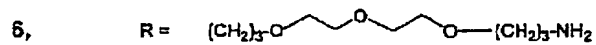
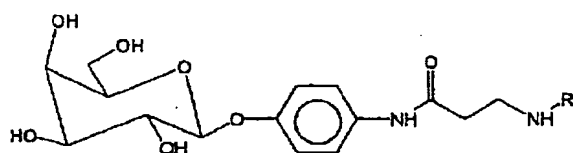
【化17】

λ₉-A 14

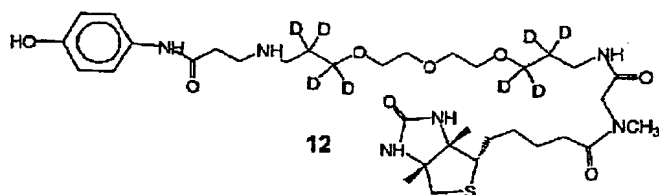
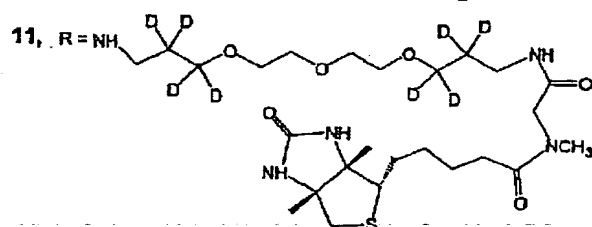
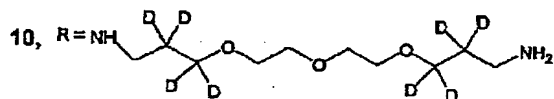
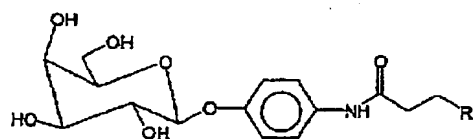
【0240】

λ₉-A 15

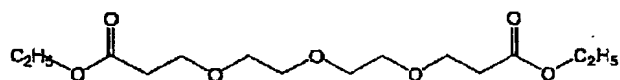
【化18】



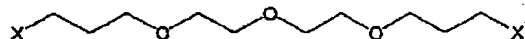
【化19】
入き-4 16



【化20】

N#CCCCOCCOCN 13

14



15, $X = OH$

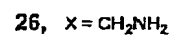
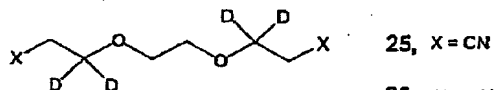
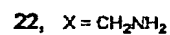
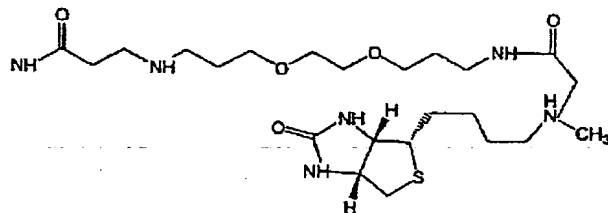
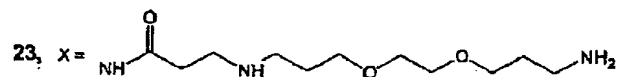
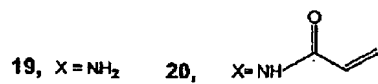
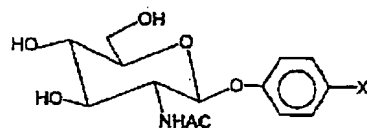
16, X = Cl

17, $X = \text{CN}$

18. $X = \text{CH}_2\text{NH}_2$

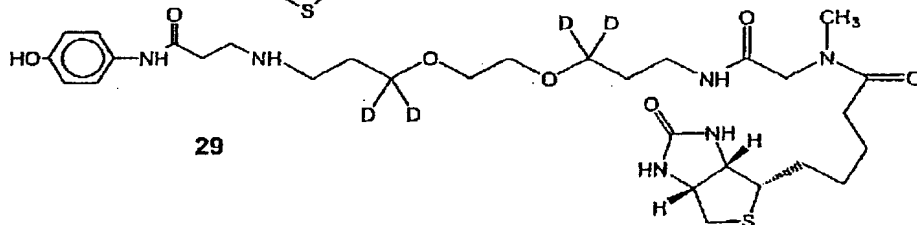
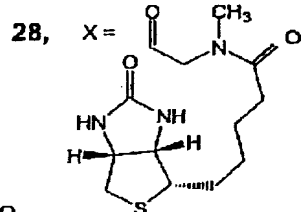
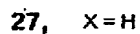
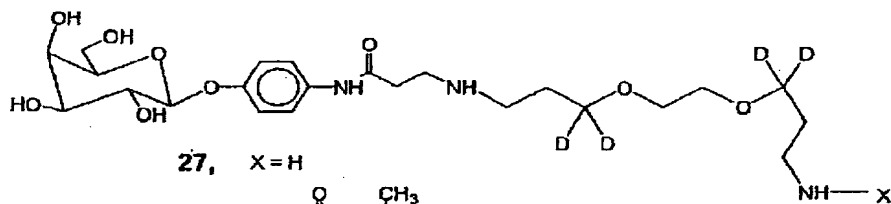
【化 2 1】

スキーム 18



【0244】

スキーム 19 【化22】

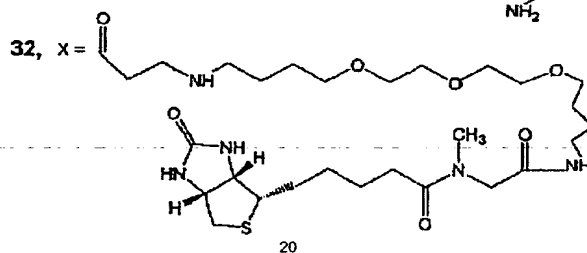
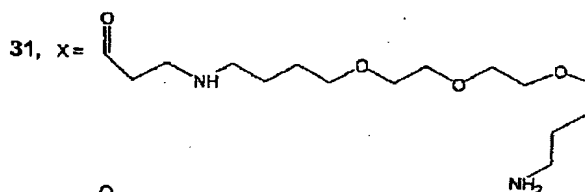
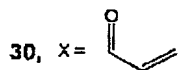
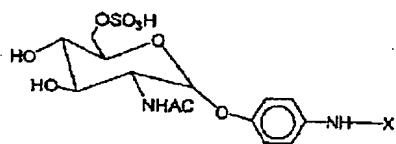


【0245】

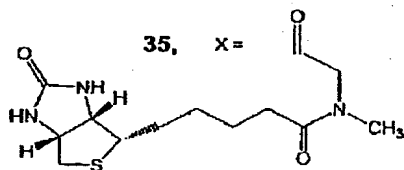
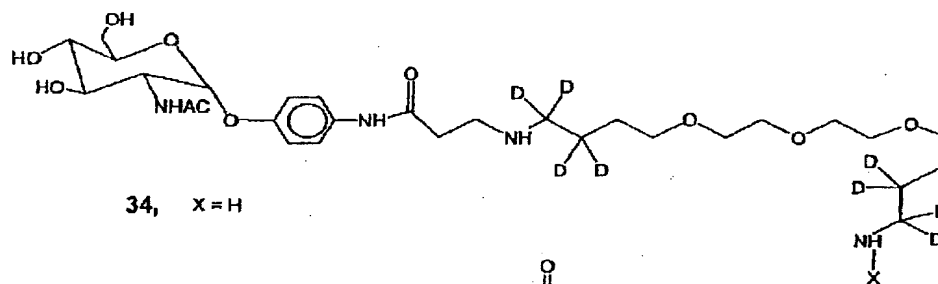
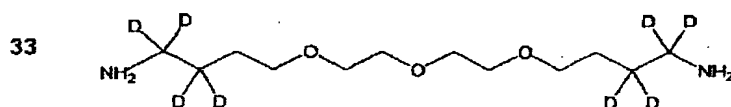
【化23】

104

【化24】
入き-ム 21



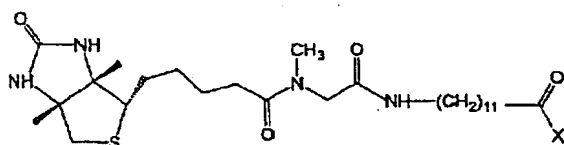
【 0 2 4 6 】



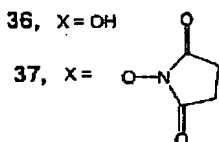
【 0 2 4 7 】

【化 2 5】

式 22

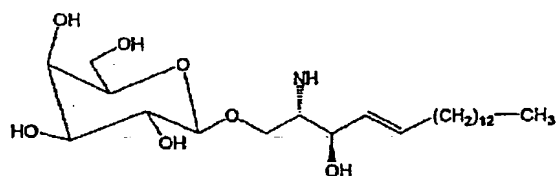


36, X = OH

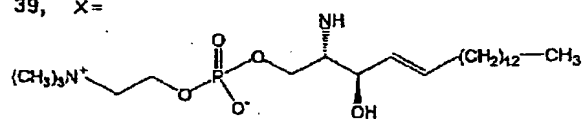


37, X =

38, X =



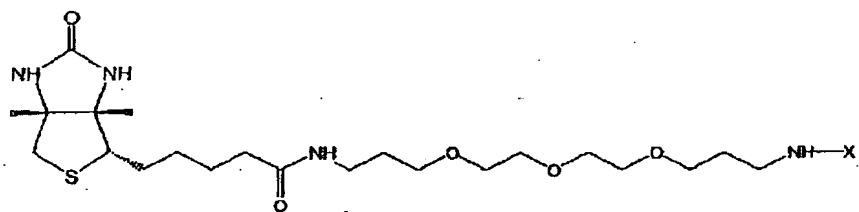
39, X =



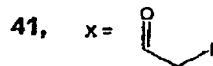
【0248】

【化26】

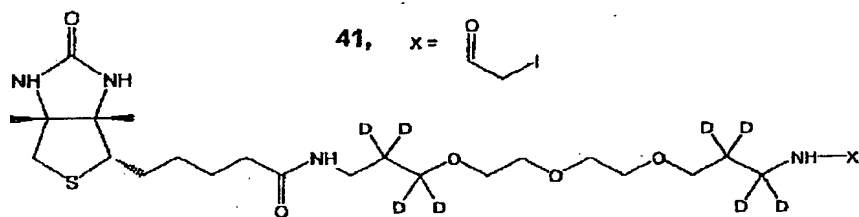
式 23



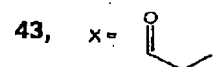
40, X = H



41, X =



42, X = H



43, X =

【0249】

【表6】

参考文献

- Ashikaga, K. (1988) Bull. Chem. Soc. Jpn. 61:2443-2450.
- Bayer, E., Wilchek, M. (1980) Methods Enzymol. 184:48-51.
- Blasby, A.J. (1994), "OWL-a non-redundant composite protein sequence database," Nucleic Acids Res. 22:3574-3577.
- Boucherle, H. (1996), "Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae*," Electrophoresis 17:1683-1699.
- Chen, Y.-T., Burchell, A. (1995), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver, C.R. (ed.) McGraw-Hill, New York, pp. 935-965.
- Clauser, K.R. (1995), "Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by two-dimensional PAGE," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5072-5076.
- Cole, R.B. (1997) Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Practice, Wiley, New York.
- De Leenheer, A.P., Thienpont, L.M. (1992), "Application of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology," Mass Spectrom. Rev. 11:249-307.
- DeRisi, J.L. (1997), "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale," Science 278:680-6.
- Dongre, A. R., Eng, J. K., Yates, J. R. (1997), "Emerging tandem-mass spectrometry techniques for the rapid identification of proteins," Trends Biotechnol. 15:418-425.
- Ducrot, A., VanOostveen, I., Eng, J. K., Yates, J. R., Aebersold, R. (1998), "High throughput protein characterization by automated reverse-phase chromatography/electrospray tandem mass spectrometry," Prot. Sci. 7:708-719.
- Eng, J., McCormack, A., Yates, J. I. (1994), "An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database," J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989.
- Figgs, D. (1998), "Electrophoresis combined with mass spectrometry techniques: Powerful tools for the analysis of proteins and proteomes," Electrophoresis 19:1811-1818.
- Figgs, D., Aebersold, R. (1998), "High sensitivity analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry: Recent developments in technology and applications," Electrophoresis 19:885-892.
- Figgs, D., Ducrot, A., Yates, J. R., Aebersold, R. (1996), "Protein identification by solid

(K(1113)

phase microextraction-capillary zone electrophoresis-microelectrospray-tandem mass spectrometry," *Nature Biotech.* 14:1579-1583.

Figgeys, D., Ning, Y., & Aebersold, R. (1997), "A microfabricated device for rapid protein identification by microelectrospray ion trap mass spectrometry," *Anal. Chem.* 69:3153-3160.

Garrels, J. I., McLaughlin, C. S., Warner, J. R., Fletcher, B., Lattar, G. I., Kobayashi, R., Schwander, B., Volpe, T., Anderson, D. S., Mesquita, F.-R., & Payne, W. E. (1997), "Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis*," 18:1347-1360.

Gerber, S.A. (1999), "Analysis of rates of multiple enzymes in cell lysates by electrospray ionization mass spectrometry," *J. Am. Chem. Soc.* 121:1102-1103.

Gygi, S.P. (1999), "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast," *Mol. Cell. Biol.* 19:1720-1730.

Gygi, S.P. (1999), "Protein analysis by mass spectrometry and sequence database searching: tools for cancer research in the post-genomic era," *Electrophoresis* 20:310-319.

Haynes, P. A., Fridpp, N., & Aebersold, R. (1998), "Identification of gel-separated proteins by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry: Comparison of methods and their limitations," *Electrophoresis* 19:939-945.

Hodges, P.E. (1999), "The Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data," *Nucl. Acids Res.* 27:69-73.

Johnston, M. & Carlson, M. (1992), in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Jones, E.W. (Ed.), Cold Spring Harbor Press, New York City, pp. 193-281.

Link, A. J., Hays, L. G., Carmack, E. B., & Yates, J. R. (1997), "Identifying the major proteome components of *Haemophilus influenzae* type-strain NCTC 8143," *Electrophoresis* 18:1314-1334.

Link, J. (1999), "Direct analysis of large protein complexes using mass spectrometry," *Nat. Biotech.* 17:111-117.

Mann, M., & Wilm, M. (1994), "Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags," *Anal. Chem.* 66:4390-4399.

Morris, A.A.M. & Turnbull, D.M. (1994) *Curr. Opin. Neurol.* 7:535-541.

Naufeld, E. & Muenzer, J. (1995), "The mucopolysaccharidoses" In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver, C.R. (Ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 2465-2494.

Oda, Y. (1998), "Accurate quantization of protein expression and site-specific

- (第6項)
- phosphorylation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6591-6596.
- Okada, S. & O'Brien, J.S. (1988) *Science* 180:10002.
- Opitzek, G.J. (1997), "Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins," *Anal. Chem.* 69:1518-1524.
- Pennington, S. R., Wilkins, M. R., Hochstrasser, D. F., & Dunn, M. J. (1997), "Proteome analysis: From protein characterization to biological function," *Trends Cell Bio.* 7:168-173.
- Qin, J. (1997), "A strategy for rapid, high-confidence protein identification," *Anal. Chem.* 69:3995-4001.
- Ronne, H. (1995), "Glucose repression in fungi," *Trends Genet.* 11:12-17.
- Scriver, C.R. (1995), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York.
- Scriver, C.R. (1995), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver, C.R. (ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 1015-1076.
- Sachl, S. & Chak, B.T. (1988), "Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification," *Anal. Chem.* 70:5150-5158.
- Segal, S. & Berry, G.T. (1995), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver, C.R. (ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 967-1000.
- Romanowska, A. (1994) *Methods Enzymol.* 242:90-101.
- Roth, F.P. (1998), "Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation," *Nat. Biotechnol.* 16:939-945.
- Shalon, D., Smith, S. J., & Brown, P. O. (1996), "A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization," *Genome Res.* 6:639-645.
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., & Mann, M. (1999), "Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14440-14445.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996), "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels," *Anal. Chem.* 68:850-858.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basral, M. A., Bassett, D. E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997), "Characterization of the yeast transcriptome," *Cell* 89:243-251.

- (表 6 のつぎ)
- Wibur, D.S. (1997) *Bioconjugate Chem.* 8:572-584.
- Yelas, J. R. d., Eng, J. K., McCormack, A. L., & Schleitz, D. (1995). "Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database," *Anal. Chem.* 67:1426-1438.
- Brockhausen, I.; Hüll, E.; Hindsgraul, O.; Schachter, H.; Shah, R. N.; Michnick, S. W.; Carver, J. P. (1989) Control of glycoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 264, 11211-11221.
- Chapman, A.; Fujimoto, K.; Kornfeld, S. (1980) The primary glycosylation defect in class E Thy-1-negative mutant mouse lymphoma cells is an inability to synthesize dolichol-P-mannose. *J. Biol. Chem.* 255, 4441-4446.
- Freeze, H. H. (1998) Disorders in protein glycosylation and potential therapy. *J. Pediatrics* 133, 593-600.
- Freeze, H. H. (1999) Human glycosylation disorders and sugar supplement therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 189-193.
- Gerber, S. A.; Scott, C. R.; Turecek, F.; Gelb, M. H. (1998) Analysis of rates of multiple enzymes in cell lysates by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1102-1103.
- Glaser, L. (1966) Phosphomannomutase from yeast. In *Methods Enzymol.* 8, Neufeld, E. F.; Ginsburg, V. (eds); Academic Press: New York 1968, pp. 183-185.
- Kaur, K. J.; Hindsgraul, O. (1991) A simple synthesis of octyl 3,6-di-O-(α -D-mannopyranosyl)- β -D-mannopyranoside and its use as an acceptor for the assay of N-acetylglucosaminyltransferase I activity. *Glycoconjugate J.* 8, 90-94.
- Kaur, K. J.; Ahon, G.; Hindsgraul, O. (1991) Use of N-acetylglucosaminyltransferases I and II in the preparative synthesis of oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 210, 145-153.
- Korner, C.; Krauer, R.; Hützbach, U.; Hansfeld, F.; Leible, L.; von Figura, K. (1998) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type V: deficiency of dolichyl-P-GlcMan9GlcNAc2-PP-dolichyl glucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95, 13200-13205.
- McMurry, J. E.; Kocovsky, P. (1984) A method for the palladium-catalyzed allylic oxidation of olefins. *Tetrahedron Lett.* 25, 4187-4190.
- Paulsen, H.; Meinjohanns, E. (1992) Synthesis of modified oligosaccharides of N-glycoproteins intended for substrate specificity studies of N-acetylglucosaminyltransferases II-V. *Tetrahedron Lett.* 33, 7327-7330.
- Paulsen, H.; Meinjohanns, E.; Reck, F.; Brockhausen, I. (1993) Synthese von modifizierten Oligosacchariden der N-Glycoproteine zur Untersuchung der Spezifität der N-Acetylglucosaminyltransferase II. *Liebigs Ann. Chem.* 721-735.
- (表 6 のつぎ)
- Preis, J. (1966) GDP-mannose pyrophosphorylase from *Arthrobacter*. In *Methods Enzymol.* 8, Neufeld, E. F.; Ginsburg, V. (eds); Academic Press: New York 1968, pp. 271-275.
- Ronin, C.; Casati, C.; Bouchilloix, C. (1981) Transfer of glucose in the biosynthesis of thyroid glycoproteins. I. Inhibition of glucose transfer to oligosaccharide lipids by GDP-mannose. *Biochim. Biophys. Acta* 674, 48-57.
- Ronin, C.; Granier, C.; Casati, C.; Bouchilloix, S.; Van Rietschoten, J. (1981a) Synthetic substrates for thyroid oligosaccharide transferase. Effects of peptide chain length and modifications in the -Asn-Xaa-Thr- region. *Eur. J. Biochem.* 118, 159-164.
- Rush, J. S.; Wachter, C. J. (1995) Transmembrane movement of a water-soluble analogue of mannosylphosphoryldolichol is mediated by an endoplasmic reticulum protein. *J. Cell Biol.* 130, 529-538.
- Schachter, H. (1985) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol.* 64, 183-181.
- Tan, J.; Dunn, J.; Jaeken, J.; Schachter, H. (1995) Mutations in the MGAT2 gene controlling complex glycan synthesis cause carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 810-817.

タンパク質の混合物中のタンパク質またはタンパク質機能の迅速な定量的分析のための、分析試薬およびこれらの試薬を使用する質量分析計に基づく方法。本方法は、3つの部分：リンカー基（L）を介してタンパク質反応基（PRG）に共有結合した親和性標識（A）を有する親和性標識タンパク質反応試薬を使用する。このリンカーは例えば、そのリンカー中の1つまたはそれ以上の原

子をそれらの安定な同位体と置換することによって差別的に同位体的に標識され得る。これらの試薬は、複合混合物からのペプチドフラグメントまたは所定のタンパク質との反応の生成物（例えば、酵素反応の生成物）の選択的単離を可能にする。単離されたペプチドフラグメントまたは反応生成物は、それらの混合物中のタンパク質の存在またはタンパク質機能の存在を特徴とする。

【0250】

【発明の効果】本発明は、従来の技術に固有の制限を克服する proteome 分析において使用され得る方法および試薬を提供する。

【図面の簡単な説明】

【図1A】図1Aは、同位体的に軽い(1457.9 u) および重い(1461.8) ビオチン化試薬で改変したペプチドの $[M+2H]^{2+}$ イオンの 4 amu 同位体分布を示すイオン捕捉質量分析計からのズームスキャンを示す。

【図1B】図1Bは、同位体的に重い試薬で標識した既知の量のペプチドの存在下で測定した5つの異なる濃度の d0 標識ペプチドのズームスキャンからの同位体比の分析から得た曲線を示す。

【図2】図2は、 α -ラクトアルブミンからのシステイン修飾ペプチドのタンデム型質量スペクトルを示す。

【図3A】図3Aは、単一のペプチド対について、MSモードで操作した質量分析計の単回スキャンを示す。

【図3B】図3Bは、単一のペプチド対について、それぞれ 993.8 および 977.7 の m/z 比を有する、イオン対の周囲の質量スペクトルの拡大図を示す。

【図3C】図3Cは、993.8 および 977.7 の m/z 比を有する、イオン対について再構成されたイオンクロマトグラムを示す。

【図4A】図4Aは、 $m/z = 998$ を有するペプチドイオンから記録された CID スペクトルを示す。

【図4B】図4Bは、図4Aの CID スペクトルとともにに行ったデータベース検索の結果を示す。これによって、タンパク質をグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(これは、タンパク質の混合物の1メンバ

【図5A】図5Aは、酵母におけるイソチームのアルコールデヒドロゲナーゼファミリーが、六炭糖(ADH1) およびエタノール(ADH2)のいずれも増殖を促

進し、遺伝子 ADH2 が、ともにグルコース抑制され、そしてガラクトース抑制され、TCA サイクルに入るアセトアルデヒドへとそれを転換することによって酵母細胞がエタノールで完全に増殖することを可能とする酵素をコードし、糖存在下、ADH1 が、アセトアルデヒドをエタノールへと変換する、その逆反応を実施することを示す。

【図5B】図5Bは、ADH1 ペプチドの質量分析結果を示す。

【図5C】図5Cは、ADH2 ペプチドの質量分析結果を示す。

【図6A】図6Aは、ブランクのESI-MS スペクトルであり、これは試薬1および2 (m/z 843 および 840) からの $(M+H)^+$ イオンのピーク、内部標準5および6 (m/z 689 および 641) のピーク、および微量の産物3および4 (m/z 681 および 637) のピークを示す。

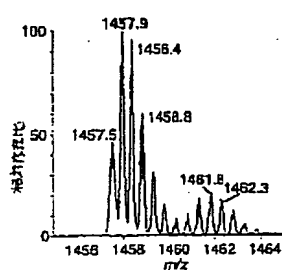
【図6B】図6Bは、健康な個体由来の細胞ホモジネートと共にインキュベートしたサンプルのESI-MS スペクトルを示し、 m/z 681 において、 β -ガラクトシダーゼ産物、そして m/z 637 において N-アセチル- α -D-グルコサミニダーゼ産物をはっきりと示す。

【図6C】図6Cは、 β -ガラクトシダーゼ欠乏症の2人の患者由来の細胞を使用した場合のESI-MS スペクトルを示し、ブランクレベル (0.9 ± 0.9 および 0.8 ± 0.6 nmol/h/mg) より上の酵素産物は、ほんのわずかしき観察されず、一方、N-アセチル- α -D-グルコサミニダーゼ活性は、はっきりと検出されることがわかる。

【図7】図7は、自動化 LC-MS/MS システムの概略図である。

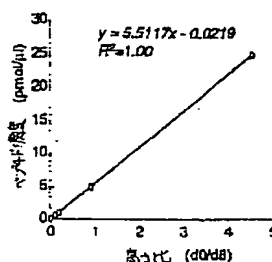
【図8】図8は、SPE-CE-MS/MS システムの概略図である。

【図1A】



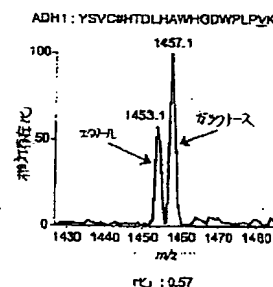
システイン-ビオチン化ペプチドを用いて得た標準曲線および安定同位体希釈による定量。A) 同位体的に軽い(1457.9 u) および重い(1461.8) ビオチン化試薬で改変したペプチドの $[M+2H]^{2+}$ イオンの 4 amu 同位体分布を示すイオン捕捉質量分析計からのズームスキャン。比(d0/d8)は4.54であった。

【図1B】

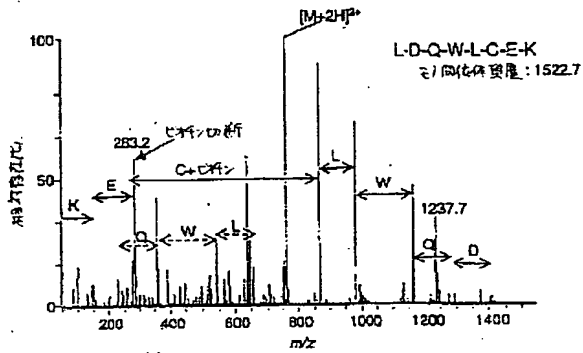


システイン-ビオチン化ペプチドを用いて得た標準曲線および安定同位体希釈による定量。B) 同位体的に重い試薬で標識した既知の量のペプチドの存在下で測定した5つの異なる濃度の d0 標識ペプチドのズームスキャンからの同位体比の分析から得た曲線。

【図5B】

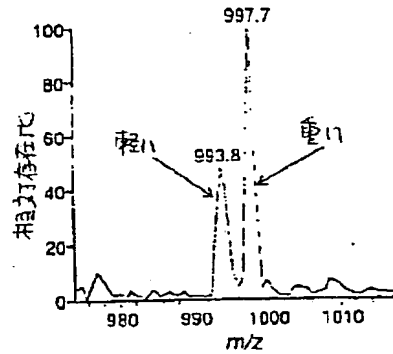


【図2】

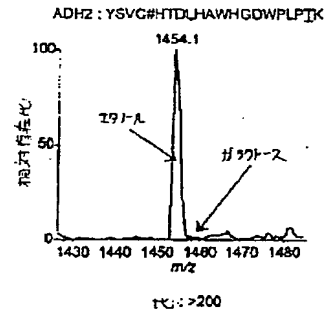


α-ラクトアルブミンからのシステイン修飾ペプチドのタンデム質量スペクトル。カスタム合成したビオチン化試薬によるシステイン残基の改変は、データベース系列にこのペプチドを正確に適合するためのSequestコンピュータプログラムの能力に影響を及ぼさなかった。

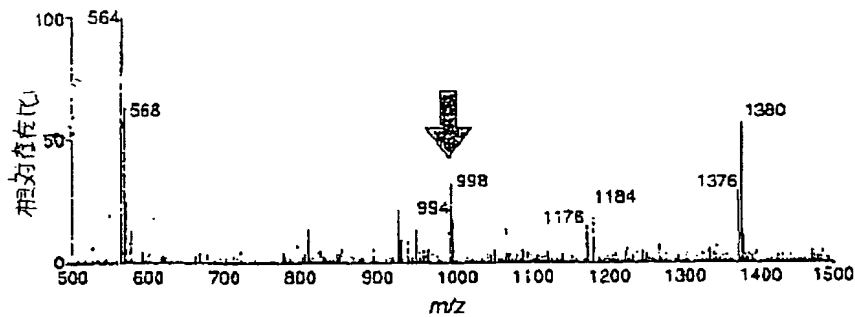
【図3B】



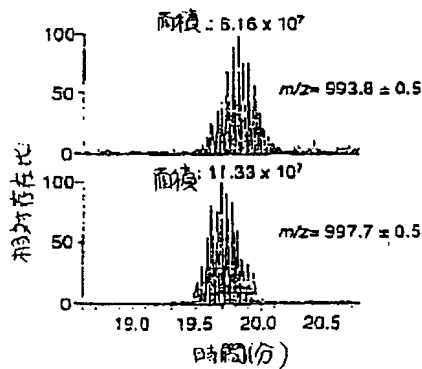
【図5C】



【図3A】



【図3C】

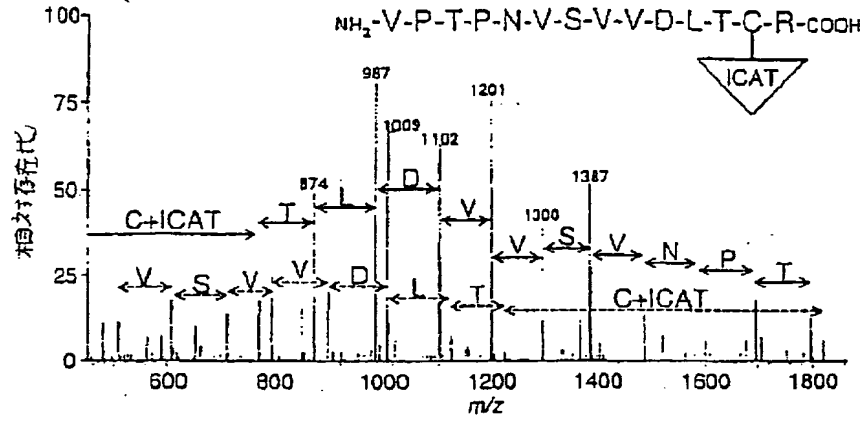


【図4B】

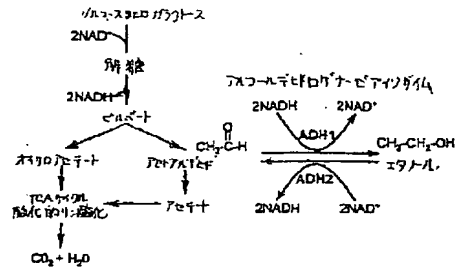
#0319_hlnawcid.0364.0364.2.out
amino acids = 91009033. # proteins = 290061. # matched peptides = 1971750
C:\LCQ\database\owl.v31.1. (C# +494.50)

#	Rank/Sp	(M-H)-	C-10 ⁻⁴	ions	Reference	Peptide
1.	1 / 1	1994.3	4.4675	17.25	G1P_RABIT	(R)VPTPNVSVVDLTC#R
2.	2 / 403	1955.1	1.7346	11.34	SCTPGL	(E)LGKPVLTANQVWESLA
3.	3 / 3	1995.0	2.5591	15.36	FLP_LACR	(N)EANPNVYTTTAAATVCTE
4.	4 / 209	1995.3	2.5335	14.35	AC2911	(Y)IALLVSDAEGGNGFVTR
5.	5 / 381	1995.1	2.4634	13.39	R55171	(L)ALLVIVAPASAGNGEDLR

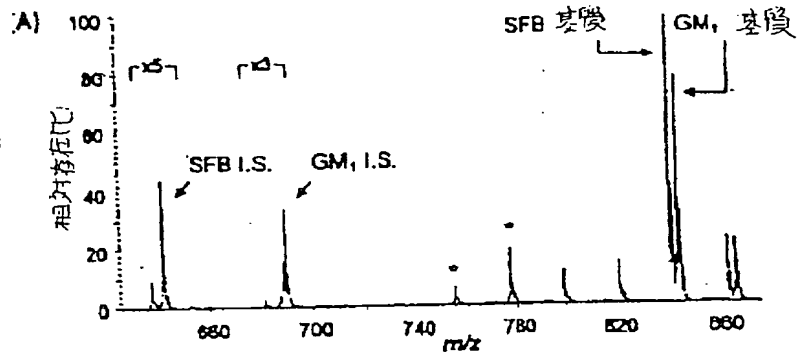
【図4A】



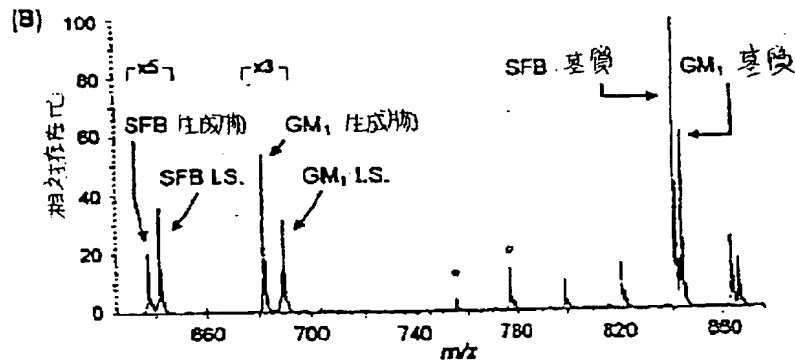
【図5A】



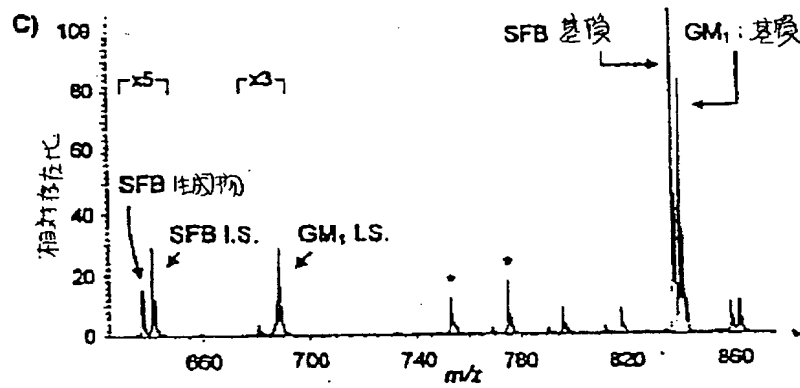
【図6A】



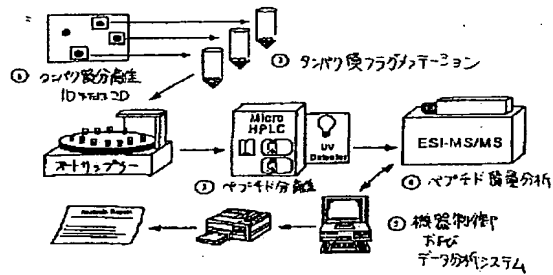
【図6B】



【図6C】

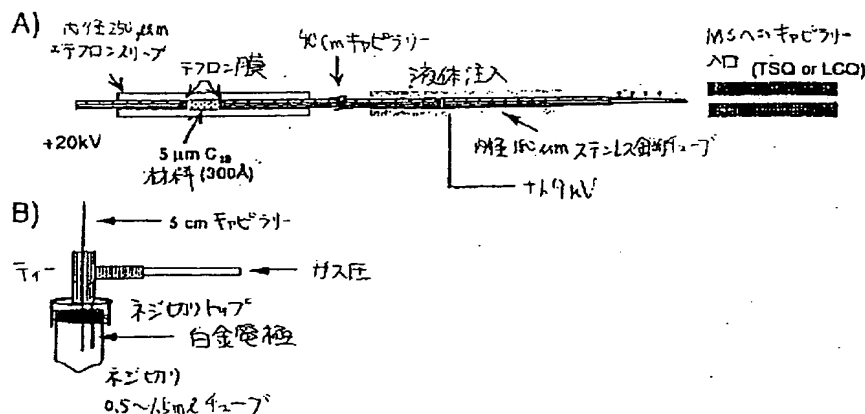


【図7】



自動化LC-MS/MSシステムの概略図。タンパク質を、典型的に、1Dまたは2D SDS-PAGEによって分離する(1)。タンパク質スポットまたはバンドを、選択し、切除し、トリプシンを用いてタンパク質分解的に切断する(2)。消化物をオートサンブラーに充填する。このオートサンブラーは、狭孔HPLCシステム(Michrom)の注入機構にそれらを連続的に送達する。個別のペプチドを分離するためにカラム勾配を自動的にかける(3)。ペプチドからの配列情報が収集される質量分析計にカラム流出液を直接に導入する(4)。記録したペプチド質量およびCIDスペクトルをSequest分析のためのデータベースに移し、初めに充填された全てのサンプルについて作成された全ての同定の最終一覧をプリンターに送る(5)。

【図8】



SPE-CE-MS/MSシステムの概略図。A) 熔融シリカキャピラリー（典型的には、内径50 μm）を、液体注入を有するエレクトロスプレー末端にて、キャピラリー内の分析物との電気的接触を確立するために、改変した。キャピラリーの末端から約5 cmにSPEデバイスを導入した。これは、内径250 μmの内部に充填しC18誘導体化した大きな孔のシリカビーズからなる。2つの熔融シリカキャピラリー間に設置したビーズを保持するための各末端にテフロン膜を有するテフロンチューブ。B) キャピラリーの注入末端を、一定の流れを保証するために一定の僅かに高圧力に維持されるシールした容器内に挿入する。白金電極をキャップを通して容器内に挿入し、電気的接触を可能にする。

【手続補正書】

【提出日】平成14年9月18日（2002. 9. 18）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】現在において、タンパク質分析技術は、ゲノム技術の自動化のスループットおよびレベルに達していない。proteome分析の最も一般的な実施は、最も一般的に二次元ゲル電気泳動（2DE）による複合したタンパク質のサンプルの分離、および引き続く分離されたタンパク質種の配列同定に基づく（Ducretら、1998；Garrelisら、1997；Linkら、1997；Shevchenkoら、1996；Gygiら、1999；Boucherieら、1996）。このアプローチは、強力な質量分析技術の発展、ならびタンパク質およびペプチド質量スペクトルデータ

と配列データベースとを関連付け、従って素早く決定的にタンパク質を同定するコンピュータアルゴリズムの発展によって大変革された（Engら、1994；MannおよびWilm、1994；Yatesら、1995）。この技術は、銀染色を含む従来のタンパク質染色法によって検出可能な必須の任意のタンパク質の同定を現在可能にする感度のレベルに達している（FigleyおよびAebbersold、1998；Figleyら、1996；Figleyら、1997；Shevchenkoら、1996）。しかし、サンプルがプロセスされる引き続く方法は、サンプルのスループットを制限し、最も敏感な方法は、自動化が困難であり、低量のタンパク質（例えば調節タンパク質）は、前濃縮なしでは検出を逃れ、従って、技術の動的な範囲を事実上制限する。2DE/（MS）法において、タンパク質は、2DEゲルの染色点の濃度測定によって定量化される。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】マイクロキャピラリー液体クロマトグラフィー (μ LC) およびデータベース検索と組み合わせた自動化データ依存電気スプレーイオン化 (ESI) タンデム型分子質量分析 (MS^n) のための方法および機器の発展は、ゲル分離されたタンパク質の同定の感度およびスピードを有意に増加した。proteome 分析に対する 2DE/ MS^n アプローチの代替として、複合したタンパク質混合物の消化によって生成されるペプチド混合物のタンデム型分子質量分析による直接分析が、提案された (Dong et al., 1997)。 μ LC-MS/ MS はまた、ゲル電気泳動分離なしで混合物から直接個々のタンパク質の大規模同定に首尾よく使用された。(Link et al., 1999; Opitz et al., 1997)。これらのアプローチがタンパク質同定を劇的に加速しながら、分析されたタンパク質の量は、容易には決定され得ず、これらの方法は、2DE/ MS / MS アプローチによっても遭遇する動的な範囲の問題を実質的に軽減することは示されていない。従って、複合したサンプルの低量のタンパク質はまた、前の濃縮なしで μ LC/ MS / MS 法によって分析するのは困難である。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】一般的に、本発明の親和性標識化タンパク質反応性試薬は、3つの部分を有する：リンカー基 (L) によってタンパク質反応性基 (PRG) に共有結合された親和性標識 (A)：

A-L-PRG

リンカーは、例えば、リンカーの1つ以上の原子をその安定な同位体に置換することによって、差次的に同位体的に標識化され得る。例えば、水素は、重水素で置換され得、 ^{12}C は ^{13}C で置換され得る。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正内容】

【0095】A、L、PRG のための上記に議論された必要性は、A-L-PRG の対応するセグメントおよびこの試薬を用いて生成される反応生成物にまで広がる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正内容】

【0102】ビオチン化スルフィドリル試薬を使用する、合成ペプチドサンプルの定量分析への、タンパク質消化物中のペプチドの相対量への、および誘導体化ペプチドのタンデム質量スペクトル分析への本方法の適用の結果は、それぞれ、図1、表1および図2に示される。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0108

【補正方法】変更

【補正内容】

【0108】(種々の細胞状態におけるタンパク質発現の定量分析) タンパク質の反応性親和性試薬戦略を、2つの非グルコース抑制状態での酵母 (*S. cerevisiae*) における定常状態のタンパク質発現の差異を研究するために適用した (表3)。細胞を、炭素源として2%ガラクトースまたは2%エタノールのいずれかを使用して、対数酵母増殖期から収集した。各細胞状態由来の、100 μ g の溶解性酵母タンパク質を、異性体が異なる親和性タグ化された試薬を用いて、独立して標識した。これらの標識されたサンプルを合せ、そしてスキーム1に記載される戦略に当てた。サンプルの1/50 (各細胞の状態由来のタンパク質、約20 μ g 当量) を分析した。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正内容】

【0124】P69SV40T細胞 (1×10^7) は、重い同位体のビオチンタグ化されたアミノ反応性試薬を使用してビオチン化され、そしてM12細胞 (1×10^7) は、対応する、軽い同位体のアミノ反応性ビオチンタグ化されたアミノ反応性試薬を用いてビオチン化される。IGF-1Rを次いで、ヒトIGF-1Rに対する抗原を使用して両方の細胞株の合わせた溶解産物から免疫沈降され、そして免疫沈降したタンパク質の全ての塊をトリプシンで消化する。トリプシンを次いで、例えば、インヒビターの添加によって中和し、そしてタグ化されたペプチドをビオチンアビジンアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。上記に記載されるように、ペプチド定量および同定のためそれぞれLC-MSおよびLC- MS^n によって、溶出したペプチドを分析する。この実験における定量は、MSにおける選択的イオンモニタリングを使用するオプションによって容易となる。このモードにおいて、IGF-1Rから誘導されると予測される、タグ化されたペプチドイオンの質量のみがモニタリングされるべきである。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正内容】

【0135】さらに、リンカーは親水性であり、基質結合体の良好な水溶性を保証し、そしてこれは、ESIによって効果的にプロトン化される塩基性基を有し、従って、質量分析法による高感度の検出を保証する。標的炭水化物基質は、 β -アラニン単位によってポリエーテルリンカーに結合される（スキーム5）。酵素産物結合体3および4をまたスキーム5に示す。結合体1および2を、スキーム5に示されるように調製した。全ての試薬を、逆相HPLCにより均質性になるまで精製し、そして高磁場 $^1\text{H-NMR}$ およびESI-MSによって同定した。基質は、後者のp-アクリロイルアミドフェニルグリコシドへのマイケル付加によってジアミンスペースーに結合され（Romanowska et al., 1994）、その中間体は、N-ピオチニルサルコシンのテトラフルオロフェニルエステルと結合された（Wilbur et al., 1997）。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0202

【補正方法】変更

【補正内容】

【0202】（23. SFB内部標準結合体（29））

1. 2mgの28を2mLの100mM Tris/10mM MgCl_2 、pH7.3緩衝液に攪拌しながら添加した。15単位の組換え型 β -D-ガラクトシダーゼ（Sigma）を添加し、そして12時間後に、混合物を逆相HPLC（Vydac C-18分取スケールカラム、6mL/分 移動相： H_2O （0.08% TFA）/ACN（0.08% TFA））により精製した。収量0.7mg。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0217

【補正方法】変更

【補正内容】

【0217】（例示的 MS^N 技術および計測）アミノ酸配列によるタンパク質の同定のための自動化LC-MS/MSシステムが、開発されている。略図を図7に示す。オートサンプラー、ESI三重極-四重極MS/MS装置にオンライン接続されたキャピラリーHPLCシステムおよびデータシステムからなる、このシステムを以下の方法で操作する：タンパク質（典型的に1Dまたは2Dゲル電気泳動により分離される）を、特定のプロテアーゼ（通常、トリプシン）を用いて切断し、得られ

た切断フラグメントをオートサンプラーに配置する。37分おきに、オートサンプラーは、1サンプルをHPLCシステムに注入し、そしてペプチドはキャピラリー逆相クロマトグラフィーによって分離される。クロマトグラフィーカラムから分離されたペプチドが溶出すると、これらのペプチドはESIプロセスによりイオン化され、MSに入り、電荷比（ m/z ）に対する質量が測定される。ペプチドの強度が予め測定した強度閾値（intensity threshold）を超える任意のペプチドイオンが、自動的にこの装置によって選択され、不活性ガスを含む衝突セル内で衝突される。これらの衝突により、主にペプチド骨格の結合でのペプチドフラグメント化（衝突誘発される解離（CID））が生じる。このCIDフラグメントの質量が測定され、そしてデータシステムに記録される。ペプチドのCIDスペクトルは、連続MS/MSスペクトルを有する配列データベースを調査することによって、タンパク質を同定する十分な情報を含む。このことは、Sequentプログラムで達成される。このプログラムにより、CIDに対してMSで選択されたペプチドと同じ質量を有する配列データベースで各ペプチドを同定し、同重核の（isobaric）ペプチドの各々に対するMS/MSスペクトルを予想する。実験的に測定されたCIDスペクトルと対応させることで、観測したペプチドが由来するタンパク質を同定する。このシステムにより、十分に自動化した様式で、1サンプル当たり40分未満のペースで、タンパク質サンプルを分析することが可能である。各ペプチドは、独立したタンパク質の同定を意味し、そして通常多種のペプチドが1種のタンパク質から導かれるので、この方法によるタンパク質の同定は、余分であり、ゲル中で共遊走する（co-migrating）タンパク質に対して寛容である。このシステムは、ペプチド鎖の修飾された残基の検出および特徴づけのために十分に適している。LC-MS/MS技術および得られたCIDスペクトルの自動化分析は、本発明の方法のために使用され得る。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0229

【補正方法】変更

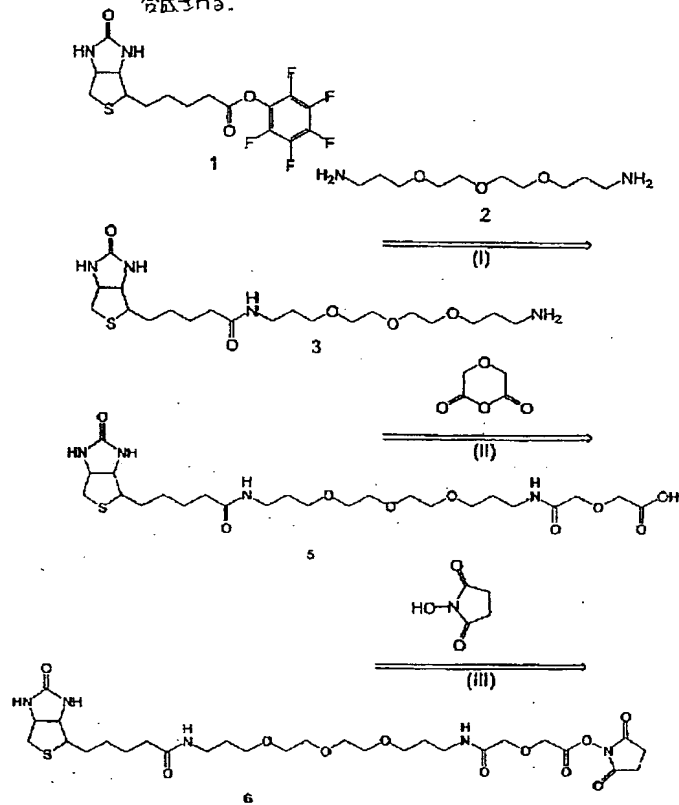
【補正内容】

【0229】

【化7】

スキーム3

遊離アミノ基のピロイン化に特異的試薬の合成。この試薬は、同位体的に重い形態(d8)または軽い形態(d0)が混在する状態で合成される。



【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0230

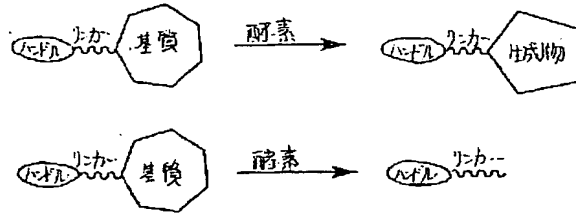
【補正方法】変更

【補正内容】

【0230】

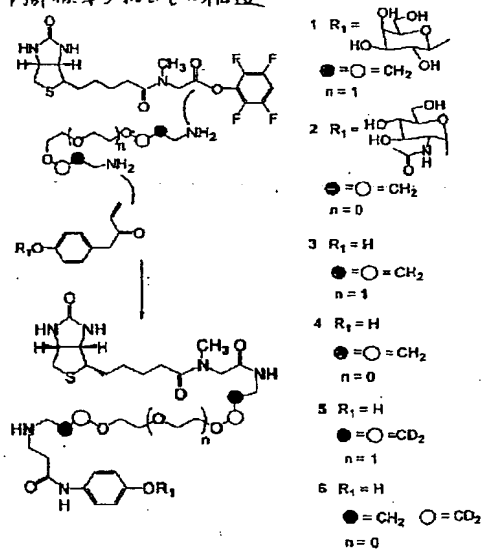
【化8】

スキーム4



スキーム5

置換結合体1及び2、生成物結合体3及び4、な5に
内部構造5及び6を構造



【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

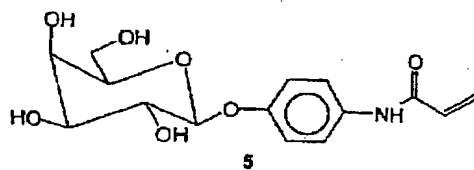
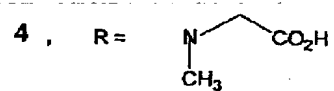
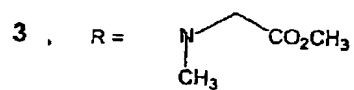
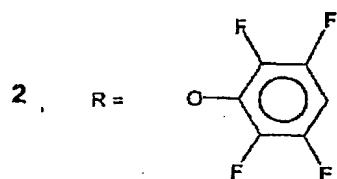
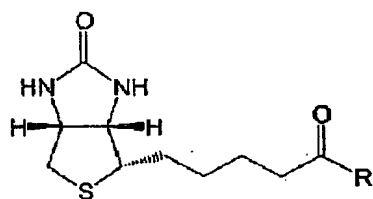
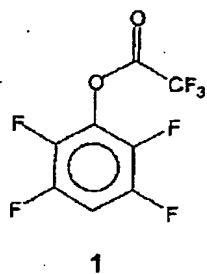
【補正対象項目名】0239

【補正方法】変更

【補正内容】

【0239】

【化17】

λ₉-A 14

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0240

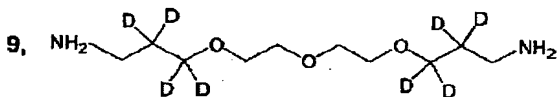
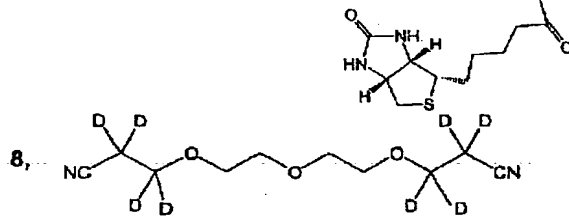
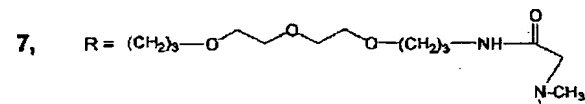
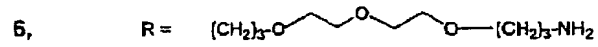
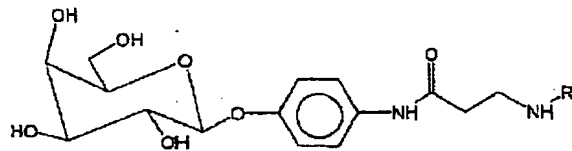
【補正方法】変更

【補正内容】

【0240】

【化18】

スクリーン 15



【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

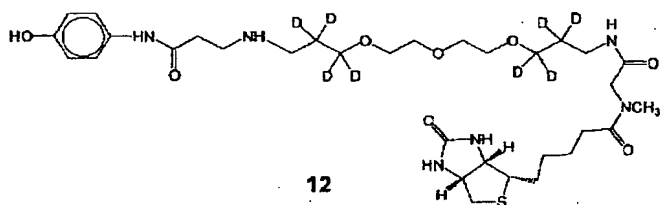
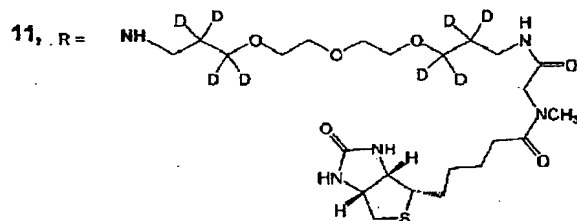
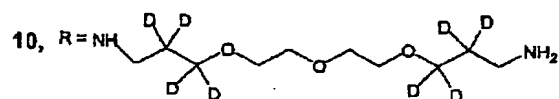
【補正対象項目名】0241

【補正方法】変更

【補正内容】

【0241】

【化19】



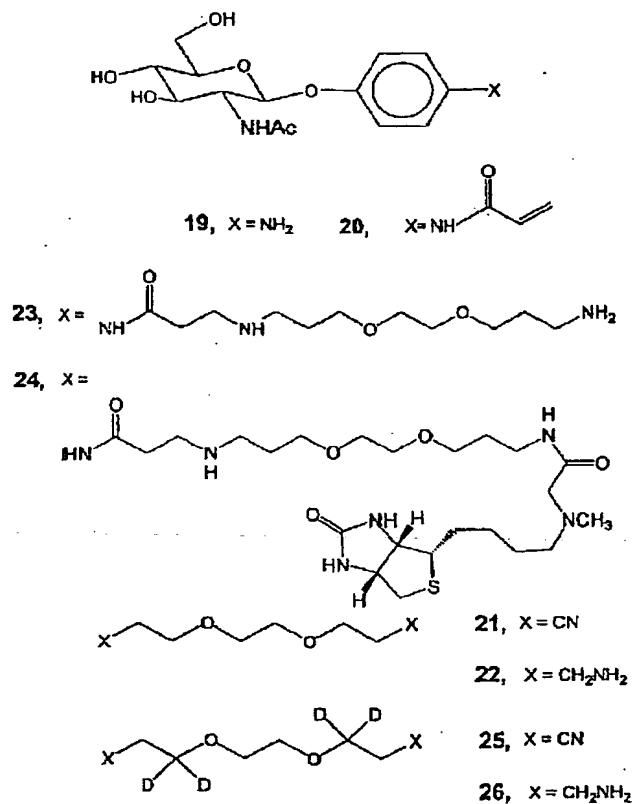
【補正内容】

【 0 2 4 3 】

【化2 1】

【補正方法】変更

図 18



【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0245

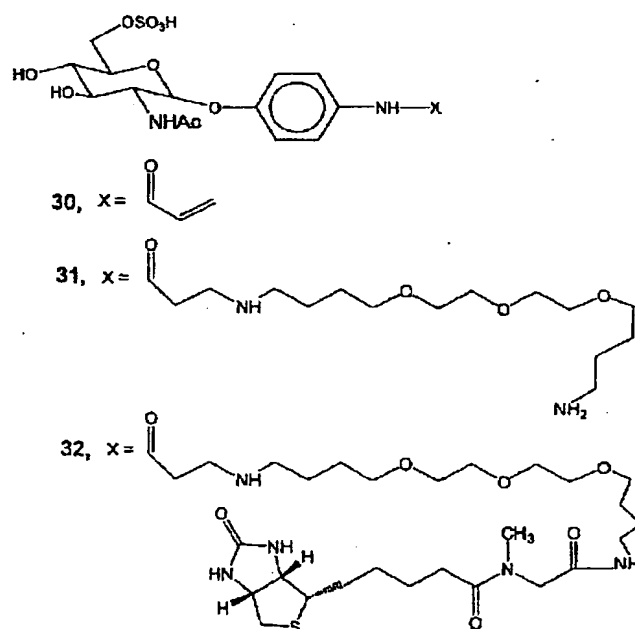
【補正方法】変更

【補正内容】

【0245】

【化23】

図 20



【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0246

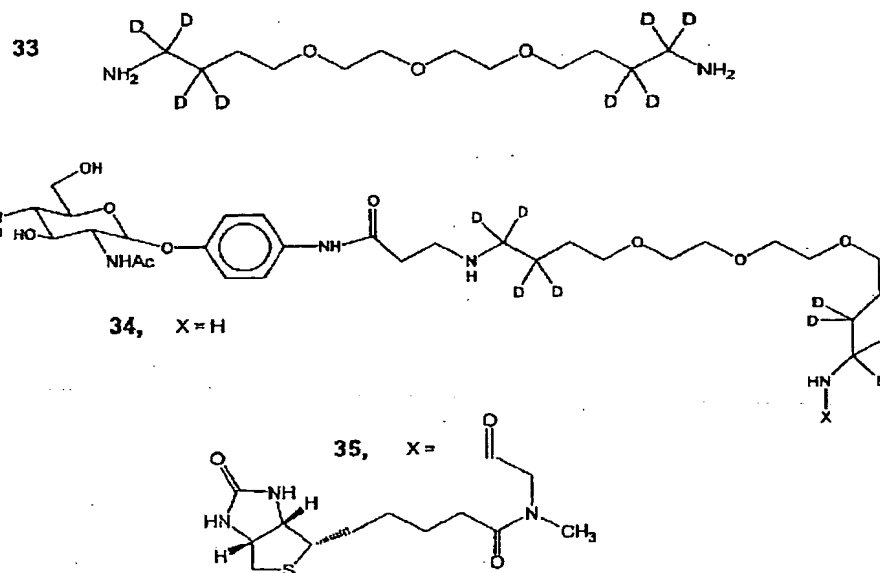
【補正方法】変更

【補正内容】

【0246】

【化24】

図 4-21



【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

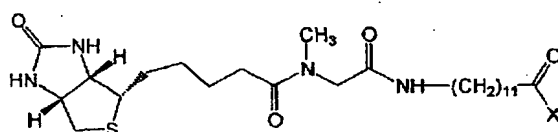
【補正対象項目名】0247

【補正方法】変更

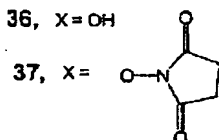
【補正内容】

【0247】

【化25】

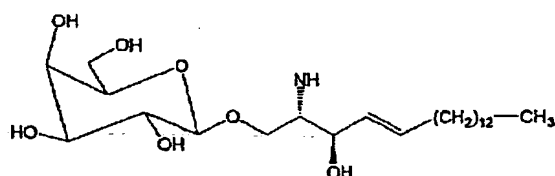
X₄-Δ 22

36, X=OH

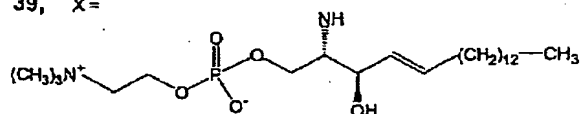


37, X=

38, X=



39, X=



【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

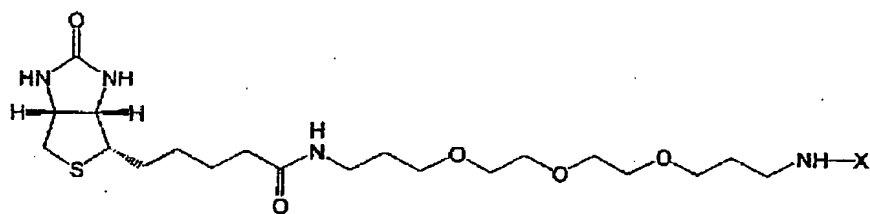
【補正対象項目名】0248

【補正方法】変更

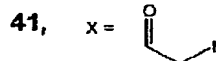
【補正内容】

【0248】

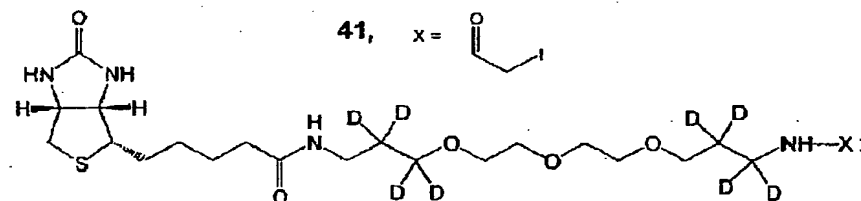
【化26】

X₄-Δ 23

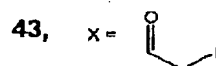
40, X=H



41, X=



42, X=H



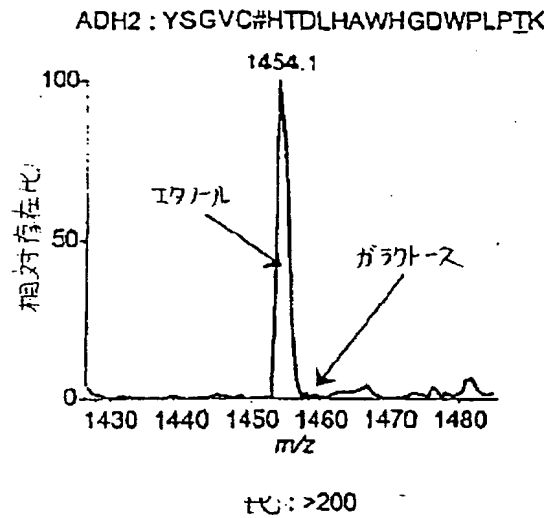
43, X=

【手続補正 21】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4B

【補正方法】変更



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 30/06
30/60
30/88

識別記号

F I

G 0 1 N 30/06
30/60
30/88

テーマコード(参考)

E
K
J

(72) 発明者 マイケル エイチ. ゲルブ
アメリカ合衆国 ワシントン 98115,
シアトル, 34ティーエイチ アベニュー
エヌイー 6203

(72) 発明者 スティーブン ビー. ジジ
アメリカ合衆国 ワシントン 98115,
シアトル, エヌイー 75ティーエイチ
ストリート エイ211 5844

(72) 発明者 シー. ロナルド スコット
アメリカ合衆国 ワシントン 98105,
シアトル, プルマン アベニュー エヌ
イー 4815

(72) 発明者 フランティセック トウレセック
アメリカ合衆国 ワシントン 98115,
シアトル, 29ティーエイチ アベニュー
エヌイー 7001

(72) 発明者 スコット エイ. ガーバー
アメリカ合衆国 ワシントン 98115,
シアトル, 27ティーエイチ アベニュー
エヌイー 7264

(72) 発明者 ビート リスト
アメリカ合衆国 ワシントン 98112,
シアトル, 16ティーエイチ アベニュー
イースト 1146

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.